Über die Einwirkung von kurzwelligem Licht auf die basischen Vitalfarbstoffe Neutralrot, Pyronin und Janusgrün B

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Henning Sauer
aus Plauen

1960

1. Referent : Prof. Dr. H. Drawert
2. Referent : Prof. Dr. Th. Eckardt

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 8. 1959
Tag der Promotion: 14. Dez. 1960

Nicht im Handel

Sonderabdruck aus Band LII, 1960, Heft 4

PROTOPLASMA

Unter besonderer Mitwirkung von J. Brachet, Bruxelles, N. Kamiya, Osaka, A. Pischinger, Wien und S. Strugger, Münster

herausgegeben von Josef Spek, Rostock, Friedl Weber, Graz, und Karl Höfler, Wien

Springer-Verlag in Wien

Alle Rechte vorbehalten

Henning Sauer:

Über die Einwirkung von kurzwelligem Licht auf die basischen Vitalfarbstoffe Neutralrot, Pyronin und Janusgrün B

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Über die Einwirkung von kurzwelligem Licht auf die basischen Vitalfarbstoffe Neutralrot, Pyronin und Janusgrün B

Von

Henning Sauer

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1959)

Einleitung

Über die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie schreiben Bräutigam und Grabner (1949) in einem Beitrag zum Gedenken an Max Haitinger, den Begründer dieser neuen Forschungsmethode: „Apparativ ist die Fluoreszenzmikroskopie in ihren großen Umrissen fertig ausgebildet, und eine weitere apparative Entwicklung ist hauptsächlich nur in der Richtung zu erwarten, daß neue und verbesserte Strahlungsquellen noch stärkere Fluoreszenzen erregen werden."

Mit dem Vorteil, den die Fluorochromierung gegenüber einer Diachromierung bietet, müssen aber auch mancherlei Nachteile in Kauf genommen werden. So sind die kurzwelligen, energiereichen Strahlen von erheblichem Einfluß auf den lebenden Organismus. Dieser wird um so stärker sein, je mehr man die Strahlenintensität durch Verwendung moderner Quecksilberhöchstdrucklampen erhöht.

Für die Epidermiszellen der Schuppenblätter von *Allium cepa*, die häufig für zellphysiologische Untersuchungen herangezogen werden, liegen verschiedene Angaben über eine UV-Strahlenwirkung vor, so von Biebl (1942 a, b, 1947), Drawert (1952), Glubrecht (1953). Es zeigt sich, daß der Kern und das Plasma hauptsächlich die Wellenlängen unter 315 mμ absorbieren (Glubrecht 1956). In diesem Wellenbereich treten die Strahlenschädigungen auch zuerst auf. Das energieärmere blaue Licht (320 bis 500 mμ) dagegen erweist sich als relativ unschädlich (Biebl und Url 1958).

Bei den Strahlenreaktionen kann es sich 1. um eine direkte Einwirkung auf das lebende System handeln oder 2. um die schwer analysierbaren sogenannten „photodynamischen Einwirkungen" (Tappeiner und

Jodlbauer 1907), bei denen die Anregungsenergie durch sensibilisierende Farbstoffe sekundär auf die lebende Materie übertragen wird. Eine zusammenfassende Darstellung gibt Simonis (1956).

Über eine sehr schnelle und empfindliche Reaktion vitalgefärbter Zellen auf kurzwelliges Licht berichtet Strugger (1940a) bei seinen Untersuchungen über das Neutralrot. Er konnte den Nachweis erbringen, daß der Farbstoff auch im Plasma, und zwar wahrscheinlich in Form seiner fluoreszierenden Base, in lipoiden Phasen gespeichert wird. Während der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung beginnen die zuerst dunkel erscheinenden Vakuolen nach und nach grün bis grüngelb zu fluoreszieren.

Aus den Untersuchungen von Drawert und Metzner (1956) geht hervor, daß es sich bei dieser Strahlenreaktion um eine Veränderung des von der Zelle gespeicherten Farbstoffs handelt. Aus dem kationischen Neutralrot entsteht durch die Strahleneinwirkung eine negativ geladene, grün fluoreszierende Verbindung. Die lebende Zelle erweist sich also in diesem Fall gegenüber den UV-Strahlen als wesentlich beständiger als der synthetische Farbstoff.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung muß deshalb außer den beiden bereits angeführten Reaktionen kurzwelliger Strahlen auf vitalgefärbte Objekte, der direkten oder der indirekten, photodynamischen Einwirkung, als dritte Möglichkeit noch eine Änderung der verwendeten Farbstoffe in Betracht gezogen werden.

Die Beobachtungen von Drawert und Metzner (1956) über die Veränderung des Neutralrots sollen im folgenden näher analysiert werden.

Nachdem es sich einmal gezeigt hat, daß selbst bei der Kürze der mikroskopischen Beobachtungszeiten mit Reaktionen der verwendeten Farbstoffe zu rechnen ist, erscheint es notwendig, weitere Angaben in der Literatur zu überprüfen, ob nicht die dort beschriebenen Veränderungen des Fluoreszenzbildes ebenfalls auf eine Beeinflussung des Farbstoffes zurückgeführt werden können.

So berichtet z. B. Strugger (1941) von einer reversiblen Strahlenwirkung auf pflanzliche Protoplasten, die mit Pyronin vitalgefärbt waren. Besonders seit der Benutzung der intensiven Quecksilberhöchstdrucklampen als Erregerlicht mehren sich die Angaben, daß eine Fluorochromierung bestimmter Granula immer erst einige Zeit, nachdem das gefärbte Objekt dem kurzwelligen Licht ausgesetzt worden ist, erzielt werden kann (Drawert 1953; Drawert und Kärber 1956; Kärber 1958; Kuttig 1957; Mix 1958).

In diesem Zusammenhang ist auch eine Mitteilung von Gutz (1958) von Interesse, der seine Versuche über die Granulafluorochromierung von Pilzmycelien (Gutz 1956) mit einer lichtstärkeren Fluoreszenzeinrichtung wiederholt hat. Danach wird die durch Reduktionsprozesse der lebenden Objekte hervorgerufene Granulafluoreszenz mit Nilblau bei einer intensiven Bestrahlung wesentlich schneller erreicht als bei Verwendung eines Kohlebogen-Erregerlichtes. Aber auch am fixierten Material werden Fluoreszenzveränderungen beobachtet. Dies deutet ebenfalls auf eine Beeinflussung des Farbstoffes hin.

Material und Methode

Im Verlauf der Untersuchungen fanden folgende Farbstoffe bzw. Fabrikate Verwendung:

Neutralrot (Chroma). Nach den Untersuchungen von Drawert und Metzner (1956) verhält sich der Farbstoff übereinstimmend mit den Präparaten von Bayer und von Merck.

Pyronin (Grübler-Chroma, Schuchardt-Görlitz und Merck), P. extra (Grübler-Chroma), P. stand. (Bayer), Pyronin B echt stand. (Bayer), Akridinrot (Grübler).

Janusgrün B (IG und Grübler Bln.-West).

Safranin O (Chroma), S. T. (Merck), S. stand. (Grübler-Leipzig), Phenosafranin stand. (Bayer), Methylenviolett (Hollborn & S., Leipzig), M. stand. (Bayer).

Für die vergleichenden Vitalfärbungen benutzte ich die Oberepidermis der Schuppenblätter von *Allium cepa*. Die Präparation erfolgte in der von Strugger (1949) angegebenen Weise.

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit der großen Fluoreszenzeinrichtung von Zeiss-Winkel durchgeführt, mit einer Quecksilberhöchstdrucklampe (Type Osram HBO 200) als Erregerlicht. Für den Höchstdruckbrenner wird eine Brenndauer von etwa 200 Std. angegeben. Nach einem Betrieb von 20 bis 40 Std. macht sich jedoch eine deutliche Abnahme der Strahlungsintensität bemerkbar. Dies ist an verschiedenen Bestrahlungseffekten, wie dem Ausbleiben von Fluoreszenzlöschungen und von Schädigungen bei Vitalfärbeversuchen, zu erkennen. Quantitative Messungen über die Lichtstärke und über qualitative Änderungen konnten nicht durchgeführt werden; so sind im folgenden stets nur die verschiedenen Einwirkungszeiten angegeben. Es soll aber darauf hingewiesen werden, daß das Alter des Brenners darüber entscheiden kann, ob überhaupt oder nach welcher Zeit eine Reaktion festzustellen ist.

Die Beobachtung (Neutralrot, Janusgrün, Fluoreszent X) erfolgte hauptsächlich im Blaulicht (Filter 2 × BG 12, 3 mm, Sperrfilter OG 4 + OG 5). Für Untersuchungen im UV-Licht (Pyronin) diente die Filterzusammenstellung UG 2, 2 mm + UG 5, 2 mm zur Erregung und BG 23 + GG 4 als Strahlensperre.

Um schnelle Veränderungen des Fluoreszenzbildes durch die starke Strahleneinwirkung zu vermeiden, wurden vergleichsweise auch immer Fluoreszenzmikroskope schwächerer Lichtintensität verwendet. Dazu standen das Stativ BX der Fa. Leitz-Wetzlar (mit Mantelkohlen) und ein Zeiss-Winkel-Standardmikroskop in Verbindung mit einer Mikroprojektionseinrichtung der gleichen Firma zur Verfügung, wie es auch Gutz (1956) benutzte. Dieses Gerät besitzt den geringsten Anteil an kurzwelligen Strahlen und läßt deswegen die Bestrahlungseffekte teils gar nicht oder erst nach relativ langer Zeit erkennen.

Die Bestrahlungen der reinen Farbstofflösungen in vitro wurden mit einer Hochleistungsmikroskopierleuchte von Zeiss-Winkel durchgeführt, die zuerst mit dem Quecksilberbrenner HBO 74 ausgestattet war. Für eine präparative Gewinnung der unter der Lichteinwirkung entstandenen Produkte erwies sich die Intensität dieses Brenners jedoch als zu gering, so daß er gegen den Brenner HBO 200 ausgewechselt wurde. Für diese Versuche wurde die ungefilterte Strahlung ausgenützt. Verschiedene Filter (UG 1, UG 5, BG 12 u. a.) kamen nur für orientierende Untersuchungen zur Anwendung. Die Farbstofflösungen befanden sich in kreisrunden Küvetten (Durchmesser 5 cm, Dicke 2 cm) mit Halsansatz aus gewöhnlichem Glas, die den Querschnitt des Strahlenkegels in 2 cm Abstand vor den Filterhaltern der Lampe genau ausfüllten.

Um die Versuche auch bei Sauerstoffabschluß durchzuführen, mußte auf die Küvetten ein Gaswascheinsatz mit Schliff aufgesetzt werden. Obwohl für diese

Versuche Glühlampenreinstickstoff (Osram, O_2-Gehalt $< 1 \cdot 10^{-4}\%$), der zur weiteren Desoxygenierung mehrere Vorlagen mit alkalischer Pyrogallollösung durchperlte, verwendet wurde, durfte beim Arbeiten mit reduzierten Farbstoffen während der Dauer der Lichteinwirkung kein ständiger Stickstoffstrom hindurchgeleitet werden, da die immer noch vorhandenen Sauerstoffspuren nach und nach zu einer Reoxydation führten. Nach Reduktion mit $Na_2S_2O_4$, Rongalit oder Wasserstoff mit Palladium als Katalysator (Palladium-Lösung nach Paal, Schuchardt-München) und Aufsättigung der Lösung mit Stickstoff mußte die Gaszufuhr abgeklemmt werden. Für einen Druckausgleich während der durch die Strahlen bedingten Erwärmung sorgte dann eine Schlauchverbindung, die über ein leeres Vorschaltgefäß wieder in eine Pyrogallollösung führte, um beim Abkühlen eine Reoxydation zu verhindern.

Es war notwendig, für Ausschüttelungsversuche von reduzierten und bestrahlten Farbstofflösungen mit organischen Medien auch diese vorher gründlich zu desoxygenieren. Mit Hilfe eines in die Küvette eingeschliffenen Schütteltrichters konnte das hydrophobe Lösungsmittel ohne Sauerstoffzutritt zu der Farblösung hinzugegeben werden (Abb. 1).

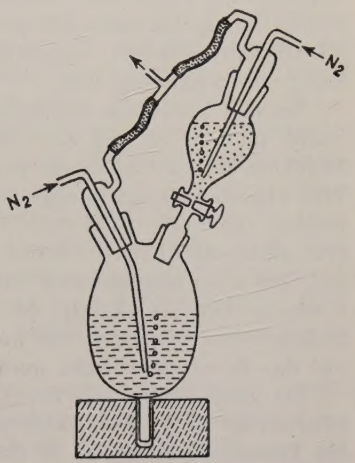

Abb. 1. Küvette für Bestrahlungs- und Ausschüttelungsversuche in einer Stickstoffatmosphäre.

Für die chromatographischen Analysen wurde das Papier Nr. 2043 b von Schleicher und Schüll, als mobile Phase ein Aceton-Leitungswassergemisch (4 : 6) und für die präparative säulenchromatographische Aufarbeitung das Zellulosepulver Nr. 123 der gleichen Firma benutzt.

Zur Untersuchung der Ladungseigenschaften der Farbstoffe und Bestrahlungsprodukte dienten das Papierelektrophoresegerät „Elphor" nach Graßmann und Hanning von Dr. Bender und Dr. Hobein (Karlsruhe-München-Zürich) und die dazugehörigen Filtrierpapierstreifen Nr. 2043 a Mgl von Schleicher und Schüll. Die angelegte Spannung betrug 110 V, bei einem Strom von 0,4 mA je Streifen. Eine nähere Beschreibung des Apparates findet sich bei Wunderly (1955). Als Durchtränkungsflüssigkeit wurden die Phosphatpuffer (Strugger 1949) in doppelter Konzentration (m/75) verwendet. Um genau kontrollierbare Bedingungen zu haben, mußten zuerst die möglichen Aziditäts-Veränderungen während der Betriebszeiten gemessen werden. Bei einer durchschnittlichen Laufzeit von 5 bis 8, gelegentlich auch bis zu 20 Std., traten im sauren Bereich pH-Verschiebungen um $\pm$ 0,2 und im alkalischen Bereich um $-0{,}5$ bis -1 auf.

I. Versuche mit Neutralrot

A. Die Einwirkung von UV-Strahlen auf Neutralrotlösungen

a) *Bestrahlungen von Neutralrotlösungen*

Nach Drawert und Metzner (1956) geht aus den Elektrophoreseversuchen hervor, „daß der basische, also positiv geladene Farbstoff Neutralrot, wenn er nicht im völlig dissoziierten Zustand (pH 2) vorliegt, unter der Strahlenwirkung einer Quecksilberhöchstdruck- oder Kohlenbogenlampe eine grünfluoreszierende, negativ geladene Komponente abspaltet".

Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Farbstofflösungen, die bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen bestrahlt wurden, und durch eine chromatographische Analyse konnte dies bestätigt werden. Die besten Ergebnisse erzielt man, wenn das Neutralrot (NR) als undissoziierte Base vorliegt.

In diesem Zusammenhang muß auf die spektralphotometrischen Untersuchungen von Bartels (1956a und b) hingewiesen werden, der bei wässerigen Neutralrotlösungen eine starke Assoziationsbildung feststellte. Schon bei geringer Konzentration (1:500.000) liegt ein Teil der NR-Ionen als Dimere vor, bei höher konzentrierten Lösungen ($5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l = etwa 1:8000) werden mit großer Wahrscheinlichkeit Tetramere gebildet. Die Assoziation zu Dimeren führt bei fluoreszierenden Farbstoffen häufig zu einer beträchtlichen Herabsetzung der Fluoreszenzausbeute. Das Assoziationsverhalten wässeriger NR-Lösungen könnte auch für die Strahlenwirkung von Bedeutung sein.

Bei den Versuchen erweist es sich als störend, daß die Farbbase schwer wasserlöslich ist und bei pH 6,8—7,0 leicht ausflockt; denn nur die gelöst vorliegenden Moleküle der Farbbase sind unter diesen Versuchsbedingungen strahlenempfindlich. Eine abgestandene, gesättigte wäßrige NR-Basenlösung entspricht nur einer Konzentration von etwa $1:25\,000 = 1{,}6 \cdot 10^{-4}$ Mol/l. Ich erhielt diesen Wert, indem ich eine alkalische filtrierte Farblösung mit einem Tropfen HCl versetzte und die Farbtiefe mit einer angesäuerten NR-Lösung bekannter Konzentration verglich. Deshalb erwies es sich als günstig, die NR-Base durch Ausschüttelung in einem neutralen hydrophoben Lösungsmittel anzureichern. Die Konzentration kann so mindestens auf das Zehnfache erhöht werden.

Bei Bestrahlung mit der Quecksilberhöchstdrucklampe erwärmt sich das Lösungsmittel stark, wenn keine besonderen Kühlvorrichtungen zur Verfügung stehen. Da Temperaturen bis zu 95° C gemessen wurden, konnte nur eine schwer siedende Flüssigkeit verwendet werden. Am besten eignete sich dazu Toluol (Siedepunkt 112° C). Nach guter Durchmischung auf der Schüttelmaschine und gründlicher Phasentrennung wurde die rein orangegelbe, gelbgrün fluoreszierende Lösung für 30 Minuten der energiereichen Strahlung ausgesetzt. Eine Reaktion findet sowohl im Blaulicht als auch im ultravioletten Bereich statt. Je nach dem Alter des Quecksilberbrenners wird mehr oder weniger schnell eine Umfärbung nach Rot sichtbar. Es bildet sich zuerst ein feiner Niederschlag, der sich bald in größeren Flocken absetzt. Die restliche Lösung zeigt nur noch einen blaßgelben Farbton, die intensive Fluoreszenz ist gelöscht. Durch scharfes Zentrifugieren läßt sich das Sediment abtrennen. Es enthält hauptsächlich die negativ geladenen Anteile mit Beimengungen von unverändertem NR. Häufig zeigt das Toluol auch dann noch einen rötlichen Farbton. Durch Ausschütteln mit destilliertem Wasser können die sauren, lipophoben Komponenten völlig herausgelöst und später zusammen mit dem Niederschlag aufgearbeitet werden. Es empfiehlt sich, das bereits bestrahlte Toluol wieder frisch mit der Farbbase anzureichern und für weitere Reaktionen zu verwenden. Im Toluol befindet sich eine rein hydrophobe Komponente, von der weiter unten noch zu berichten ist (S. 532).

Der Niederschlag wurde zur restlosen Entfernung des Lösungsmittels bei 60 bis 80° C getrocknet. Die Erwärmung verursacht keine Veränderung der Substanz, da ja auch beim Bestrahlungsvorgang ähnliche Temperaturen auftreten. Überhaupt ist der negativ geladene Stoff gut hitzebeständig, so daß Lösungen ohne Schaden bei 100° C eingedampft werden können.

Der Niederschlag löst sich in 90%igem Alkohol beim Erwärmen. Zurück bleibt eine geringe Menge eines ganz feinen dunkelbraunen Pulvers, das sich weder in

wäßrigen noch in hydrophoben Medien lösen läßt und nicht weiter untersucht wurde. Zur weiteren Reinigung muß der Alkohol aus der mit Wasser verdünnten Lösung wieder abdestilliert werden. Steht genügend intensiv bestrahlte Lösung zur Verfügung, so bildet sich beim Entfernen des Alkohols aus der wäßrigen Lösung ein feiner Niederschlag. Er ist mit der bereits erwähnten „hydrophoben Komponente" identisch.

b) Versuche zur Reingewinnung des Bestrahlungsproduktes

Drawert und Metzner (1956) zeigten, daß eine gute Abtrennung der grün fluoreszierenden Komponente vom unveränderten NR mit Hilfe der Papierchromatographie erreicht wird (Abb. 3, S. 374). Die Trennung ist exakt durchführbar, jedoch können durch Eluieren der Farbflecke nur schwache Farblösungen gewonnen werden. Ergiebiger ist die Ausschüttelung der alkalisch gepufferten bestrahlten Farblösungen mit neutralen hydrophoben Lösungsmitteln wie Toluol oder Benzol. Entsprechend der Farbstoffverteilung zwischen beiden Medien (Drawert 1940, 1948) läßt sich das unveränderte NR durch wiederholten Wechsel der organischen Lösung fast völlig herauslösen. Dazu ist es jedoch notwendig, alkalische Puffer zu verwenden, die sich nicht ohne weiteres wieder entfernen lassen.

Durch Aluminiumoxyd (Woelm) findet keine Trennung der Komponenten statt. Eine einfache Kapillaranalyse (Ruhland 1908; Strugger 1949) durch Auftropfen der bestrahlten Lösung auf ein Fließpapier zeigt, daß das Neutralrot als Farbkation zentral adsorbiert wird, während sich ein grün fluoreszierender Ring nach außen ausbreitet. Der rote Fleck bleibt auch beim Nachsaugen von Wasser unverändert liegen.

Zur Reinigung wurde deshalb Zellulosepulver verwendet (Schleicher & Schüll, Nr. 123). Als Säule dienten Glasfilternutschen verschiedener Größe, die sich bequem füllen ließen. Das Fortschreiten der Adsorptionszone des roten Farbstoffs war auf diese Weise gut zu verfolgen. Aus anderen Versuchen ging hervor, daß zur Festlegung von 1 g NR etwa 100 bis 110 g Zellulosepulver nötig sind. Zur Beschleunigung der Trennung wurde die Lösung im Vakuum durchgesogen; dank der großen Oberfläche des staubfeinen Pulvers wird das NR völlig adsorbiert, während die anionische Komponente glatt hindurchläuft.

Vor der Verwendung des Zellulosepulvers ist eine Reinigung notwendig. Der erste Anteil der durch die Säule gelaufenen Lösung zeigt eine der anionischen Komponente ähnliche bräunlichgelbe Farbe, aber eine hellblaue Fluoreszenz. Im Papierchromatogramm war ein entsprechender Fleck nicht nachzuweisen. Die leichte Opaleszenz des Filtrates ließ vermuten, daß es sich hierbei um einen löslichen Anteil des Zellulosepulvers handelte. Eine größere Menge Pulver wurde daraufhin durch häufiges Durchsaugen von destilliertem Wasser gewaschen, bis das Filtrat klar blieb. Beim Einengen der Waschlösung wurde eine etwas klebrige braune Masse gewonnen, die nach Säurehydrolyse deutliche Fehling-Reaktion gab.

Ein Versuch, das Zellulosepulver im großen zu reinigen, scheiterte, da nach dem Trocknen bei 60 bis 80° C wieder lösliche Bestandteile auftraten. So mußte die Zellulose vor jedem Versuch gründlich gewaschen werden. Wird ein anderes Lösungsmittel als Wasser verwendet (Aceton, Alkohol), so muß auch mit diesem das Pulver vorbehandelt werden.

Nach dem Passieren der Säule (chromatographische Prüfung auf Abwesenheit von unverändertem NR, sonst Wiederholung des Vorganges) und gründlichem Auswaschen der anionischen Komponente wurde die gewonnene Lösung auf dem Wasserbad bis zur Trockene eingedampft. Eine dunkelbraun glänzende Kruste blieb zurück, die leicht abgekratzt und zu einem feinen Pulver zerstoßen werden konnte.

Zur Frage der Ausbeute sei erwähnt, daß sich aus einem Ansatz von 40 je eine halbe Stunde bestrahlten Küvetten von 25 bis 30 cm³ Toluollösung ungefähr 350 mg Substanz gewinnen ließen. Das entspricht einer Gesamteinwirkung von 20 Stunden auf 1000 cm³ Lösung.

Hieraus wurde eine „Stammlösung A" 1 : 1000 mit Aqua bidest. hergestellt. Sie hat einen pH-Wert von ungefähr 6,4 (pH Aqua bidest. = 6,1), ist braungelb gefärbt und fluoresziert gelbgrün. Im diffusen Licht ist die Lösung über Monate unverändert haltbar.

c) Vitalfärbungen mit dem anionischen Bestrahlungsprodukt

Als Untersuchungsobjekt wurden in Übereinstimmung mit den Neutralrot-Arbeiten von Strugger (1940a), Toth (1952), Drawert und Metzner (1956) wiederum die Oberepidermiszellen von *Allium cepa* herangezogen (Zittauer Gelbe). Die Farbkonzentration der Pufferlösungen betrug 1 : 10 000. Die Färbezeiten variierten zwischen 5 Minuten und mehreren Stunden. Im Hellfeld war keine Farbstoffspeicherung zu beobachten. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab folgendes Bild:

pH 2,4: Die Membran ist ungefärbt, der Farbstoff aber im Plasma mit intensiver gelber Fluoreszenz gespeichert. Deutlich heben sich die einzelnen Plasmastränge von der dunklen Vakuole ab. Die Kerne fluoreszieren gelb. Einige Zellen zeigen Vakuolenkontraktion oder eine Aufquellung des ganzen Plasmaschlauches, der dann homogen gelb gefärbt ist. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um nicht mehr voll vitale Zellen (Plasmolyse in Rohrzucker noch normal), da beim längeren Verweilen in der sauren Pufferlösung alle Zellen absterben. Während der Beobachtung nimmt die Fluoreszenzintensität etwas ab.

pH 3,5: Gute Plasma- und Kernfluoreszenz. Nach einiger Zeit sind noch 40% der Zellen lebend und zeigen deutliche Plasmaströmung. Es handelt sich hier um eine Anfärbung der Plasmagrundsubstanz, eine Granulafluoreszenz ist nicht zu beobachten. Die toten Wundrandzellen bleiben völlig farblos. Während der Beobachtung tritt stärkere Fluoreszenzschwächung auf.

pH 4,5: Das Farbbild entspricht dem bei pH 3,5, die Fluoreszenzintensität ist schwächer und blaßt während der Beobachtung auch schneller aus. Bei allen untersuchten pH-Werten ist auf dem Epidermishäutchen ein Längsgradient der Fluoreszenzstärke zu bemerken.

pH 5,4: Das Plasma wird nur noch schwach angefärbt, der Fluoreszenzton ist etwas grünlicher.

pH 5,9: Bei längeren Färbezeiten ist eine geringe Plasmafluoreszenz gerade noch wahrnehmbar.

pH 6,3: Eine Fluoreszenz des Plasmas ist nicht mehr nachweisbar. Der Farbstoff zeigt somit ein Verhalten, wie es von sauren Oxyfluoronfarbstoffen bekannt ist (Drawert 1941).

Die Aufnahme der negativ geladenen Bestrahlungskomponente erfolgt am besten im stark sauren pH-Bereich. Auf die schwächere Speicherung bei Verringerung der Acidität der Pufferlösungen ist auch die schnellere Fluoreszenzverminderung zurückzuführen. Die Aufnahme ist ebenso bei Sauerstoffabwesenheit zu beobachten. Dies deutet darauf hin, daß hier ein reiner Lösungsvorgang in lipophilen Phasen des Plasmas vorliegt. Bei Übertragung in alkalische Puffer wandert der Farbstoff bald wieder aus. Drawert und Metzner (1956) konnten keinen Unterschied in dem vital-

färberischen Verhalten von bestrahlten und unbestrahlten Neutralrotlösungen feststellen. Dies ist auch bei dem geringen Anteil der sauren Komponente in wäßrigen Lösungen nicht möglich, da höchstens im sehr sauren Gebiet eine Speicherung eintritt, während im neutralen Puffer die aufgenommene Neutralrotbase durch ihre intensive Fluoreszenz alles überdeckt. Wird der saure Stoff von außen der Zelle geboten, so kommt es zu keiner Zellsaftfluoreszenz. Diese kann nur durch Bestrahlung von Vakuolen erreicht werden, die mit normalem NR angefärbt sind.

d) Ausschüttelungsversuche, Löslichkeit und Verhalten im elektrischen Feld

Zur Prüfung auf Lipoidlöslichkeit führte ich Ausschüttelungsversuche der gepufferten Farblösungen mit Benzol durch. Im Vergleich hierzu sei auf die Verteilung des unveränderten Neutralrots zwischen einer hydrophilen und einer hydrophoben Phase hingewiesen, wie sie D r a w e r t (1940, 1948) gibt. Als Puffer dienten n-HCl, m/30 Phosphatlösungen und n-KOH. Dank der relativ hohen Salzkonzentration und dem fast neutralen pH-Wert der Stammlösung waren nur ganz geringfügige Aziditätsveränderungen zwischen den reinen Pufferlösungen und den Farbpuffern zu beobachten. Die Ergebnisse sind der Tab. 1 zu entnehmen.

Im stark sauren Gebiet hat die Lösung eine rote Eigenfarbe. Bei Verringerung der Wasserstoffionenkonzentration tritt ein Farbumschlag nach Gelb ein. Die fast reingelbe (bei stärkerer Verdünnung mehr grüngelbe) Fluoreszenz ist im Bereich von pH 5—10 am intensivsten, mit zunehmender Ansäuerung wird die Fluoreszenz gelöscht. Auch die stark alkalischen Lösungen zeigen eine geringe Fluoreszenzverminderung. Bei der Ausschüttelungsreihe mit Benzol weist dieses von pH 6 abwärts eine stärker werdende gelblichgrüne Fluoreszenz auf. Die Eigenfarbe ist schwach gelblich. In der wäßrigen Phase ist keinerlei Unterschied zu der nicht ausgeschüttelten Lösung festzustellen.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Vitalfärbung zeigt gute Übereinstimmung. Bei Ansäuerung finden wir eine zunehmende Lipoidlöslichkeit, was auf eine Zurückdrängung der Dissoziation und Bildung der Farbsäure hinweist. Allerdings scheinen sich nur geringe Spuren im Benzol zu lösen. Ausschüttelungen mit Toluol, Xylol, Hexan, Äther und Chloroform führen zu den gleichen Ergebnissen.

Zur Überprüfung dieser Befunde untersuchte ich das Verhalten des Bestrahlungsproduktes im elektrischen Feld bei verschiedenen pH-Werten. Nähere Angaben hierüber sind bereits unter „Material und Methodik" gemacht worden.

Es sollte einmal festgestellt werden, wieweit sich die Papierelektrophorese für quantitative Messungen bei Farbstoffanalysen verwenden läßt. Ganz allgemein ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Feldstärke proportional, sie ist von dem Charakter und der Zahl der Ladungen eines Ions, dessen Größe und Molekülform abhängig (M u s s o 1958). Aus der Größe der Wanderung lassen sich Rückschlüsse auf die Ladungs- und Dissoziationsverhältnisse ziehen. Auf diese Weise konnten z. B. die isoelektrischen Punkte von Proteinen usw. bestimmt werden (Literatur bei W u n d e r l y 1954. Dort finden sich auch weitere Angaben über die Unter-

schiede zwischen freier Elektrophorese und Papierelektrophorese, über den Einfluß von elektroosmotischen Kräften, Temperaturschwankungen, verschiedenen Papiersorten und deren unterschiedlichen Eigenladungen, die Bedeutung der Salzkonzentration der Pufferlösungen usw., worauf hier nur hingewiesen werden kann).

Während im Chromatogramm (Drawert und Metzner 1956, S. 374, Abb. 3a) mit Aceton-Wasser (4 : 6) keine weitere Auftrennung des sauren Farbstoffes zu bemerken ist, findet im elektrischen Feld eine

Tab. 1. *Ausschüttelungsversuche mit der anionischen Komponente einer bestrahlten Neutralrotlösung und Benzol bei verschiedenen pH-Werten der wässerigen Phase.*

Farbpuffer pH	Wäßrige Lösung		Verteilung zwischen hydrophiler Phase		lipophiler Phase	
	Eigenfarbe	Fluoreszenzintensität	Eigenfarbe	Fluoreszenzintensität	Eigenfarbe	Fluoreszenzintensität
n-HCl	rot	—	rot	—	schwach	++++
1,5		∓		∓	gelblich	++++
2,5		+		+		++++
3,5		++		++		+++
4,6	↑	+++	↑	+++		+ (+)
5,9	↓	++++	↓	++++	↓	+
6,4		++++		++++	farblos	(+)
6,8		++++		++++		—
8,8		++++		++++		—
10,1		+++		+++		—
12,1		+++		+++		—
n-KOH	gelb	++	gelb	++		—

deutliche Trennung in sechs verschiedene Anteile statt (Abb. 2). Gelegentlich läßt sich in alkalischen Pufferlösungen noch eine schwache siebente Komponente unterscheiden. Über die unterschiedliche Wanderung gibt Abb. 3 Auskunft.

Zur Auswertung werden die Wanderungsstrecken der einzelnen Komponenten pro Stunde berechnet und gegen den pH-Wert der Pufferlösung aufgetragen. Die einzelnen Meßpunkte sind Mittelwerte aus 5 bis 10 Einzelmessungen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist konzentrationsabhängig, wobei eine Erhöhung der aufgetragenen Farbstoffmenge eine schnellere Wanderung bedingt. Bei gleichen Konzentrationen kann eine befriedigende Übereinstimmung erzielt werden. Gerade bei der Untersuchung saurer Farbstoffe, die meist wesentlich schneller wandern als basische, ist zu beachten, daß die Besprühung des Papierstreifens mit der Pufferlösung völlig gleichmäßig durchgeführt wird. In den beiden Pufferkammern muß unbedingt Niveaugleichheit herrschen, weil es sonst durch Heberwirkung zu unkontrollierbaren Verschiebungen kommt. Im Tageslicht sind die einzelnen Farbflecke nur ganz schwach zu erkennen; unter der Quarzlampe zeigen sie grünliche Fluoreszenzen unterschiedlicher Intensität und Farbtönung. Eine nähere Bezeichnung anzuführen, hätte hier wenig Sinn, da die Fluoreszenzfarbe konzentrationsabhängig ist. Die dritte Komponente zeichnet sich durch gelbe Eigenfärbung und eine intensive Gelbfluoreszenz aus.

Die Elektrophoreseversuche zeigen, daß aus der in Toluol gelösten Neutralrotbase durch die Einwirkung des kurzwelligen Lichtes mindestens sechs verschiedene negativ geladene Komponenten entstehen, die sich in ihrem Wanderungsvermögen und damit auch in ihren Ladungseigenschaften beträchtlich unterscheiden.

Die wiedergegebenen Kurven der sechs Komponenten lassen sich aus den schon dargelegten Gründen nicht ohne weiteres miteinander vergleichen, da der chemische Aufbau der verschiedenen Bestrahlungsprodukte unbekannt ist. Der Anstieg der einzelnen Kurven in Abhängigkeit vom pH-Wert der Pufferlösung dürfte aber wenigstens einen Hinweis auf das Dissoziationsverhalten des Stoffes geben.

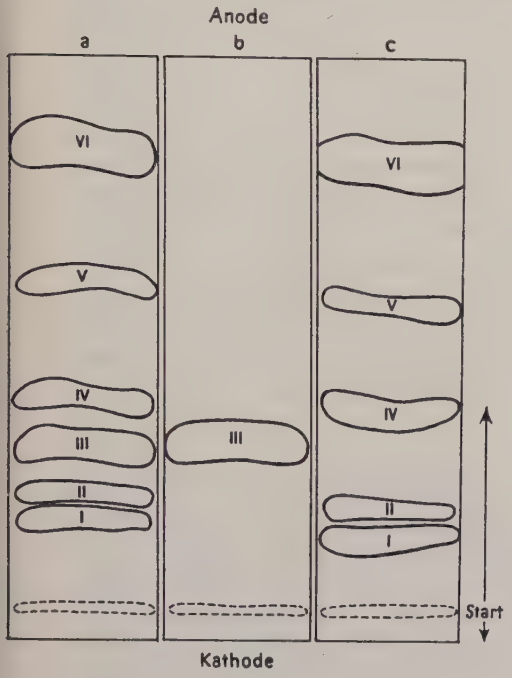

Abb. 2.

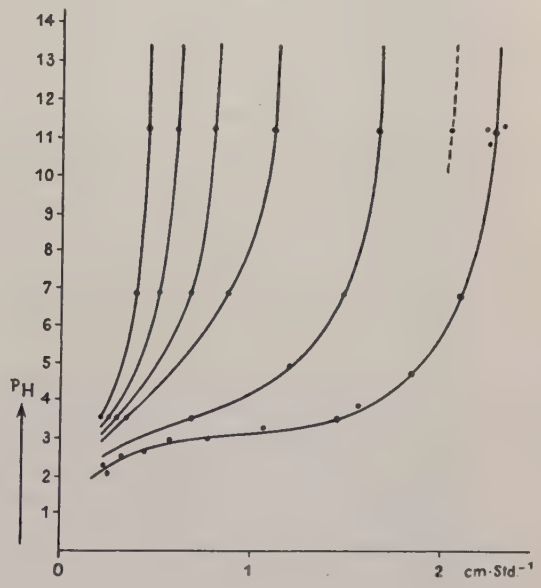

Abb. 3.

Abb. 2. Papierelektrophoretische Trennung der anionischen Komponenten, die bei der Bestrahlung einer Neutralrotlösung (Farbbase) in Toluol entstehen. *a* = Stammlösung A, *b* = lipophile Komponente, *c* = ausgeschüttelte Restlösung. (Phosphatpuffer pH 11,1; Laufzeit 5 Stunden.)

Abb. 3. Die unterschiedliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der in Abb. 2 dargestellten anionischen Komponenten I bis VI (– – – – = eine nicht immer zu beobachtende, bei stark alkalischer Reaktion auftretende schwache 7. Komponente).

Nachdem elektrophoretisch nachgewiesen wurde, daß das Bestrahlungsprodukt nicht einheitlich ist, erhebt sich sofort die Frage, welche der hier aufgezeigten Komponenten für die vitale Plasmafärbung pflanzlicher Zellen verantwortlich ist. Aus den geringen Farbunterschieden ergaben sich rein visuell keine Anhaltspunkte, eine weitere chromatographische Auftrennung mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen gelang nicht.

Im Anschluß an die Ausschüttelungsversuche mußte nach lipoidlöslichen Anteilen gesucht werden. Dazu wurde die gewonnene „Stammlösung A“ (1 : 1000) stark angesäuert und mit Benzol wiederholt durchgeschüttelt, bis dieses keine Fluoreszenz mehr aufwies. In Benzol lösen sich noch geringe Wassermengen (in 100 ml 2,11 ml H_2O bei 20°); es war nötig, dieses mit wasserfreiem Kupfersulfat zu entfernen, um so alle lipoidunlöslichen sauren Komponenten auszuschalten. Äther eignet sich wegen des relativ hohen Wassergehaltes nicht zur Extraktion. Das eingeengte Benzol hat eine schwach gelbliche Farbe und fluoresziert intensiv gelbgrün. Durch Überführung in doppelt destilliertes Wasser und Vertreibung der organischen Phase ließ sich eine rein gelbe Lösung gewinnen, die auch unter der Analysenlampe reingelb aufleuchtet. Zur Feststellung, um welche von den sechs Komponenten es sich hier handelt, wurden die Stammlösung, der lipoidlösliche Farbstoff und die neutralisierte unlösliche Restlösung elektrophoretisch verglichen. Abb. 2 *a, b, c* zeigt eindeutig die Identität der „lipoidlöslichen“ mit der gelbfluoreszierenden Komponente III.

Die Ergebnisse bei der vitalen Anfärbung von Zwiebelzellen stimmen mit den bereits geschilderten (S. 524) überein. Durch die erhöhte Konzentration ist die Cytoplasma- und Kernfärbung noch verstärkt. Im Ausschüttelungsversuch mit Benzol zeigt dieses eine gerade noch wahrnehmbare Fluoreszenz bei pH 6,3.

e) *Strahlenwirkung auf die sauren Komponenten*

Wie schon erwähnt worden ist, verblaßt während der mikroskopischen Beobachtung die gelbe Plasmafluoreszenz — in Abhängigkeit von der Dauer der Färbezeit und der verwendeten Konzentration — recht bald. Ein völliges Verlöschen wird selten beobachtet, auch nach längerer Bestrahlungszeit fluoresziert das Plasma noch schwach grünlich. Hier kann aber bereits eine Strahlenschädigung vorliegen (Drawert 1952). Eine Bestrahlung der in Toluol gelösten Komponente für 30 Minuten mit der Quecksilberhöchstdrucklampe vernichtet die gelbe Eigenfarbe völlig, eine Fluoreszenz ist nur noch ganz schwach zu erkennen.

In der Literatur ist die Erscheinung der Fluoreszenzlöschung durch UV-Strahlen bei den verschiedensten Stoffen beschrieben worden. Dabei ist die Größe des Fluoreszenzabfalles sehr von dem verwendeten Lösungsmittel abhängig. Kriegel und Herforth (1957) finden beim Benzpyren eine stärkere Löschung in Aceton gegenüber Benzol bei gleicher Strahlendosis. v. Brand (1955) beschreibt eine völlige Fluoreszenzlöschung einer Methylcholanthrenlösung in Benzol. Unter den Bedingungen der angewandten Strahlung soll dabei aus Benzol Chinon entstehen, das für den Bestrahlungseffekt verantwortlich gemacht wird. Direkte Zugabe von Chinon führt ebenfalls zu einer Fluoreszenzlöschung.

Zur Kontrolle wurden auch Bestrahlungen in wäßrigen Lösungen durchgeführt. Das Ergebnis ist das gleiche. Sowohl im dissoziierten Zustand (alkalische Lösung) als auch im sauren Milieu wird der Farbstoff weiter zerstört. Ebenso wie die lipophile Komponente ist die nicht lipoidlösliche Restlösung strahlenempfindlich, wenn vielleicht auch nicht in dem Maße wie der gelbe Farbstoff. Hierüber könnten nur genaue quantitative Messungen Auskunft geben.

Zusammenfassend läßt sich bis jetzt sagen, daß durch die Einwirkung energiereicher UV-Strahlen auf die gelöste Neutralrotbase negativ geladene, gelblichgrün gefärbte und ebenso fluoreszierende Zwischenprodukte entstehen, die wiederum im gleichen Licht in farblose Substanzen übergehen. Die zunächst im Elektrophoreseversuch nachgewiesenen sechs Verbindungen treten bereits nach zwei Sekunden Bestrahlung auf.

Wichtig wäre die Kenntnis der jeweils wirksamen Wellenlängenbereiche für die Bildung und für die Zerstörung der sauren Komponenten. Hierzu müßten genaue Absorptionsmessungen durchgeführt werden. Eine weitere präparative Auftrennung würde aber über den Rahmen dieser Untersuchungen hinausführen. Die Verwendung einer Hochspannungselektrophorese-Apparatur mit kontinuierlicher Arbeitsweise führte zu keinen Erfolgen.

f) *Die Art der photochemischen Reaktion. Der Einfluß des Lösungsmittels*

In allgemeinchemischer Hinsicht ist die Frage interessant, welche Veränderungen durch die energiereichen Strahlen am Neutralrotmolekül hervorgerufen werden. Beim Neutralrotmolekül ist die Entstehung einer dissoziierfähigen sauren Gruppe eigentlich nur durch die Anlagerung von Sauerstoff denkbar.

Die photooxydative Zerstörung von Farbstoffen ist vielfach eingehend untersucht worden, da die Erscheinung des Ausbleichens von gefärbten Gegenständen von großer Bedeutung für die Praxis ist. Nach den Untersuchungen von Gebhard (1911, weitere Literatur bei Bachér 1929) werden dabei durch Anlagerung von Sauerstoff oder auch Wasser (Bedeutung der Luftfeuchtigkeit für das Ausbleichen, vgl. Rein 1934) an die im Licht aktivierten Gruppen Farbstoffperoxyde, Peroxydhydrate oder Phenole gebildet, die mehr oder weniger beständig sein können, meist aber zu ungefärbten Verbindungen mit saurem Charakter abgebaut werden.

Zum Nachweis eines Sauerstoffeinflusses auf Neutralrot wurde die in Toluol gelöste Base mit Stickstoff desoxygeniert und unter Luftabschluß bestrahlt. Normalerweise deutet schon nach 5 bis 10 Minuten eine Rotfärbung den Beginn der Niederschlagsbildung an; hier war auch nach einstündiger Einwirkung keinerlei Veränderung zu beobachten. Zur Kontrolle bestrahlte ich eine wäßrige, schwach gepufferte Lösung nach Vertreibung des Sauerstoffes; die Flüssigkeit blieb völlig klar und zeigte keinerlei Farbveränderung im ultravioletten Licht. Eine gleiche Lösung, durch die während der Lichteinwirkung ein reiner Sauerstoffstrom geleitet wurde, ließ die Entstehung eines feinen Niederschlages erkennen (keine Base!) und fluoreszierte gelborange. Papierchromatographische und elektrophoretische Versuche bestätigten die Ergebnisse.

Die Veränderungen der Neutralrotbase durch kurzwellige Strahlen zu anionischen, grün fluoreszierenden Verbindungen erfolgt nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff, in völlig desoxygenierter Lösung tritt keine Reaktion ein. Es handelt sich also um einen photooxydativen Vorgang.

Beim intensiven Belichten eines organischen Lösungsmittels ist zu beachten, wieweit dieses selbst durch die Strahlen verändert wird. Aus der chemischen Literatur (Angaben bei Bachér 1929) geht hervor, daß die zyklischen Kohlenwasserstoffe vom Licht in Gegenwart von Sauerstoff leichter angegriffen werden als die Paraffinabkömmlinge. Die Einwirkung erfolgt hier in der Seitenkette, eine oxydative Spaltung des Benzolringes ist auf diese Weise nicht zu erreichen.

1. Toluol wird nach Ciamician und Silber (1912) durch Sonnenbestrahlung zu Benzoesäure oxydiert, außerdem treten Benzaldehyd und Ameisensäure auf. Kailan (1920) bestrahlte Toluol mit der Quecksilberlampe in Gegenwart von Wasser. Nach ungefähr 50 Stunden beobachtete er die Bildung von Benzoesäure, Ameisensäure und Oxalsäure im gegenseitigen Mengenverhältnis von 44 : 36 : 20. Zur informatorischen Überprüfung, wieweit bei einer kurzfristigen Einwirkung Zersetzungsprodukte auftreten, setzte ich für 1 Stunde wassergesättigtes Toluol dem Licht der Quecksilberhöchstdrucklampe aus. Nach Durchschüttelung mit destilliertem Wasser ließen sich in diesem reduzierende Substanzen durch Ausscheidung von metallischem Silber aus einer ammoniakalischen Silbernitratlösung in der Wärme und Entfärbung einer Kaliumpermanganatlösung nachweisen. Eine Prüfung auf Oxalsäure verlief negativ. Die Proben zeigen, daß auch bei meinen Versuchen mit einer Veränderung des Toluols zu rechnen ist.

Um Fehlschlüsse durch eine mögliche Reaktion der Lösungsmittel-Zersetzungsprodukte zu vermeiden, bestrahlte ich die Neutralrotbase noch in folgenden anderen Reagenzien. Einige Literaturangaben über das Verhalten der Stoffe im kurzwelligen Licht mögen hier mit angeführt werden.

2. Reines Benzol ist verhältnismäßig beständig (Suida 1912; Ciamician 1913), weil substituierte Gruppen fehlen, obwohl es eine starke UV-Absorption besitzt. v. Brand (1955) konnte unter ihren Versuchsbedingungen eine Umwandlung zum Chinon nachweisen. Für meine Untersuchungen ist der niedrige Siedepunkt ungünstig, vorgeschaltete Kühlküvetten würden die Strahlenintensität herabsetzen. Die Niederschlagsbildung der sauren Produkte erfolgt wie beim Toluol.

3. Xylol: Substituierte Benzolabkömmlinge werden im Licht zu den entsprechenden Säuren oxydiert (Ciamician und Silber 1912). Die Reaktionsfähigkeit nimmt mit steigender Zahl der Seitenketten zu, was besonders für paraständige Methylgruppen zutrifft. Hier ist noch zu erwähnen, daß p-Xylol und auch Toluol autoxydable Stoffe sind, die bei Lichteinwirkung mit dem Sauerstoff der Luft reagieren können und auch befähigt sind, aktivierten Sauerstoff auf andere Körper zu übertragen, die an sich im Licht beständig sind. Es muß also damit gerechnet werden, daß das organische Lösungsmittel auch als Sensibilisator auf den Farbstoff einwirken kann.

4. Paraffinum liquidum: Paraffinkohlenwasserstoffe sind im Licht wesentlich reaktionsträger, soweit es sich um gesättigte Formen handelt. Grün und Wirth (1920) konnten z. B. bei 3 bis $5^1/_2$ stündiger UV-Einwirkung auf Paraffin (Schmp. 52°) bei 160° keine Beschleunigung der Zersetzung feststellen. Zur besseren Durchschüttelung mit einer Neutralrotlösung und anschließenden Phasentrennung mußte bei meinen Untersuchungen etwas erwärmt werden.

5. Äthylalkohol besitzt nur schwach lipophile Eigenschaften. Durch die Einwirkung des UV-Lichtes kann eine Reduktion zum Aldehyd eintreten. Neutralrot wird mit rotem Farbton und roter Fluoreszenz gelöst. Nach Zugabe von einigen Tropfen KOH schlägt die Farbe nach Gelb um (UV: rein orange). Die Base fällt dabei nicht aus. Während der Bestrahlung färbt sich die Lösung wieder rot, eine Niederschlagsbildung tritt aber nicht ein.

6. Glycerin wird in wäßriger Lösung (10%) durch das Licht einer Quecksilberlampe rasch zersetzt unter Bildung von Formaldehyd und undefinierten Säuren. Das Reaktionsprodukt reduziert Fehlingsche Lösung in der Kälte (Bierry, Henri und Ranc 1910, 1911). Die Neutralrotbase ist in verdünntem Glycerin noch recht gut löslich.

Ein elektrophoretischer Vergleich der aus den verschiedenen Medien gewonnenen sauren Produkte zeigt Übereinstimmung mit Abb. 2 a. Da nicht anzunehmen ist, daß aus allen benutzten aliphatischen und zyklischen Verbindungen unter der Strahlenwirkung die gleichen Zersetzungsprodukte entstehen, dürfte damit der Beweis erbracht sein, daß die grün fluoreszierenden Komponenten reine Abkömmlinge des Neutralrotmoleküls sind.

Zum Vergleich muß noch das Verhalten einer wäßrigen Neutralrotlösung untersucht werden. Wie schon erwähnt wurde, ist die Ausbeute hier sehr gering, weil einerseits der Anteil der gelöst vorliegenden Base klein ist und andererseits die sauren Zwischenprodukte selbst wieder im kurzwelligen Licht zersetzt werden. Durch Verwendung einer größeren Küvette, wo nur etwa ein Viertel der Fläche von den Strahlen getroffen wird, kann der weitere Abbau z. T. vermieden werden. Ein Sauerstoffstrom sorgt während der Bestrahlung für gute Durchmischung, so daß sich die Spaltprodukte im verdunkelten Teil des Gefäßes anreichern können. Die mit Hilfe von Zellulosepulver gereinigte „Stammlösung B“ zeigt bei der Papierelektrophorese ein abweichendes Bild (Abb. 4). Wegen der geringen Konzentration ist selbst die Analyse unter der Quarzlampe nicht immer eindeutig. Es lassen sich nur vier verschiedene Komponenten trennen, die in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit nicht mit den oben beschriebenen übereinstimmen. Die Erscheinung ist insofern interessant und kann von Bedeutung für die Analyse der Vitalfärbung sein, da in der Zelle ebenfalls verschiedene Speicherorte vorliegen (Plasma-Vakuole) und wir über den Zustand des Farbstoffes in der Vakuole nichts Genaues aussagen können. Bei den Modell-

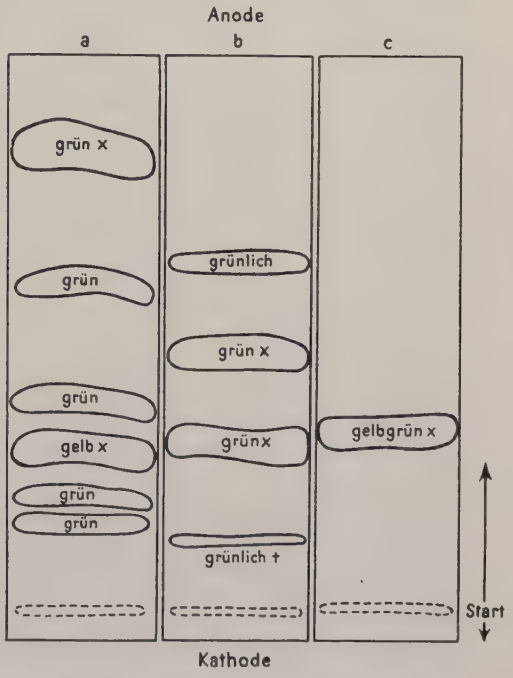

Abb. 4. Elektrophoretischer Vergleich der anionischen Komponenten, die bei der Bestrahlung einer Lösung der Neutralrotbase in Toluol (Stammlösung A = *a*) und einer wäßrigen Neutralrotlösung (Stammlösung B = *b*) entstehen. *c* = lipophiler Anteil der Stammlösung B. (Farbtonanalyse im UV; × = intensiv fluoreszierend; + = im Tageslicht ganz schwach rötlich.)

versuchen muß noch die unterschiedliche Sauerstoffspannung im Wasser und in den organischen Medien beachtet werden, wodurch weitere Zersetzungen der primär gebildeten Komponenten verhindert oder beschleunigt werden. Die Löslichkeit von Gasen in organischen Flüssigkeiten ist bei Erwärmung vielfach erhöht, während sie in Wasser rasch absinkt. Bei den hohen, während der Bestrahlung auftretenden Temperaturen wird trotz des durchgeleiteten Sauerstoffstromes die gelöste Gasmenge nur gering sein, was eine schwächere Reaktion zur Folge hat. So ist auffallend, daß bei belichteten wäßrigen Lösungen eine negativ geladene Komponente nach der elektrophoretischen Trennung noch einen rötlichen Farbton zeigt (Abb. 4 *b*).

Ein Faktor, der für die Deutung der Elektrophoreseversuche in diesem Falle von Ausschlag sein kann, ist die Anwesenheit von nicht unbeträchtlichen Mengen Chlorionen in der bestrahlten Lösung.

Für die Stammlösung A (Bestrahlung in Toluol) wurde ein pH-Wert von etwa 6.4 ermittelt. Die Lösung B (Bestrahlung in H_2O) zeigt einen höheren Säuregrad (pH 4—5). Die Ursache hierfür ist einmal in den verschiedenen Ausgangsmaterialien zu sehen, andererseits in der Eigenschaft der Zellulose, als Kationenaustauscher zu wirken. Wenn man z. B. eine neutrale Salzlösung durch Zellulosepulver schickt, so wird sie sauer, da die Metallionen in gewissem Grade gegen Wasserstoffionen ausgetauscht werden.

Während die Stammlösung A aus der reinen Neutralrotbase hergestellt wurde, die Chlorionen durch die Ausschüttelung mit organischen Medien also ausgeschieden werden konnten, läßt sich in der B-Lösung nach der Reinigung durch die Zellulosesäule eine größere Menge Chlorid nachweisen. Dies ist besonders deutlich, wenn die Lösung wegen der geringen Konzentration an sauren Zersetzungsprodukten stark eingeengt wird, wie es für die Elektrophoreseversuche notwendig ist. Die Stammlösung B hat ebenfalls eine gelbbräunliche Farbe, die bei Ansäuerung nach rot umschlägt, wobei gleichzeitig ein Verlust der gelbgrünen Fluoreszenz zu beobachten ist. Sie enthält auch einen lipoidlöslichen Anteil (Abb. 4 *c*), mit dem sich vitale Plasma- und Kernfärbungen durchführen lassen.

g) *Nachweis der hydrophoben Komponente*

Bisher wurde nur nach sauren Oxydationsprodukten gesucht. Bei der Bestrahlung im Modellversuch fielen diese mit noch unveränderten Neutralrotanteilen vermengt aus den lipophilen organischen Lösungsmitteln aus und konnten deshalb leicht abzentrifugiert werden. Der Niederschlag ließ sich fast völlig in heißem Alkohol lösen, der zur weiteren säulenchromatographischen Reinigung der sauren Komponenten wieder entfernt werden mußte. Dies geschah durch Überführung in Wasser und Erhitzen der Lösung. Bei der Verdrängung des Alkohols zeigte sich von neuem eine geringe Ausfällung (vgl. S. 522), die in abs. Alkohol, Aceton, Benzol, Toluol u. a. mit gelber Farbe und grünlichgelber bis reingelber Fluoreszenz gelöst werden kann, aber nicht in verdünntem Alkohol oder Wasser. Es handelt sich also hier um eine extrem lipophile Substanz, die auch nicht mit der Neutralrotbase identisch ist. Im elektrischen Feld wird nach 36 Stunden keinerlei Verschiebung des orange fluoreszierenden Fleckes festgestellt.

Mit diesen Befunden kann auch eine Angabe von Drawert und Metzner (1956, S. 375) erklärt werden. Bei der Beschreibung ihrer Elek-

trophoreseversuche zur Feststellung der Ladungseigenschaften der entdeckten grün fluoreszierenden Bestrahlungskomponente wird erwähnt, daß der am Start liegenbleibende Fleck bis weit ins saure Gebiet intensiv orange fluoresziert. Im neutralen und schwach sauren pH-Bereich wird diese Fluoreszenz durch das am Papier adsorbierte, nur langsam wandernde Neutralrot-Kation oder die Farbbase hervorgerufen, aber nicht bei weiterer Ansäuerung. Das deutet darauf hin, daß es sich auch hier um die „hydrophobe Komponente" handelt.

Zum Nachweis dieser Verbindung möchte ich noch folgende Versuche anführen:

1. Die Neutralrotbase wird in Toluol bestrahlt, dieses anschließend wiederholt mit verdünnter Salzsäure durchgeschüttelt, um den unveränderten Farbstoff zusammen mit den nicht lipophilen Anteilen aus der organischen Phase herauszulösen. Bei einer anschließenden Behandlung des Toluols mit verdünnter Kalilauge muß die „lipoidlösliche Komponente", entsprechend den Ausschüttelungsversuchen (S. 526), in die wäßrige Lösung übergeben.

Nach Auswaschen mit destilliertem Wasser behält das Toluol seine gelbliche Farbe und zeigt unter der Quarzlampe eine grünlichgelbe Fluoreszenz.

2. Neutralrot 1 : 2000 wird in schwach gepufferter wäßriger Lösung bestrahlt. Durch die Erwärmung ist eine verstärkte Ausfällung der schwerlöslichen Base zu beobachten, die sich durch Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure wieder beseitigen läßt. Trotzdem bleibt ein feiner Niederschlag noch erhalten, der in einem Filter aufgefangen, mit Salzsäure gewaschen und dann getrocknet wird. In Benzol ist er mit gelber Farbe löslich.

Beim Bestrahlen von Neutralrot sowohl in wäßrigen als auch in lipophilen organischen Lösungsmitteln kann die Bildung einer rein hydrophoben Komponente nachgewiesen werden, die sich in wäßrigen Medien nicht lösen läßt. Wieweit sie auch in vitalgefärbten Pflanzenzellen bei den relativ kurzen Beobachtungs- und damit Einwirkungszeiten in Erscheinung tritt, kann nicht entschieden werden, da die Fluoreszenzfarbe kaum von denen der anderen sauren Zersetzungsprodukte abweicht.

h) *Besprechung der Ergebnisse, Schlußfolgerungen auf den Aufnahmemechanismus von Neutralrot, Akridinorange und Thionin*

Werden Zwiebelepidermen, deren Vakuolen mit Neutralrot zinnoberrot gefärbt sind, im Fluoreszenzmikroskop längere Zeit beobachtet, so beginnen die zuerst dunkel erscheinenden Zellsafträume nach und nach grün bis gelbgrün zu fluoreszieren (Strugger 1940). Als Ursache dieser Fluoreszenzerscheinung konnte von Drawert und Metzner (1956) eine Veränderung des Farbstoffes nachgewiesen werden. Unter der Einwirkung des kurzwelligen Lichtes entsteht aus dem kationischen Neutralrot ein grün fluoreszierender negativ geladener Körper.

Die durchgeführten Untersuchungen bestätigten die Befunde von Drawert und Metzner (1956), daß Neutralrot unter der Einwirkung von UV- oder Blaulicht eine chemische Veränderung erfährt. Es konnte gezeigt werden, daß dabei mindestens sieben verschiedene Komponenten entstehen, die sich teilweise auf Grund ihrer spezifischen Lipoidlöslichkeit leicht trennen lassen.

Bei den Untersuchungen zeigte sich auch, daß nur die ungeladenen Neutralrotbasenmoleküle, nicht aber die dissoziierten Farbstoffkationen strahlenempfindlich sind. Ferner erfolgt eine Umwandlung des Farbstoffes nur bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff; unter einer Stickstoffatmosphäre ist keine Veränderung festzustellen. Es handelt sich also um eine photooxydative Zerstörung des Basenmoleküls.

Die grün fluoreszierenden Zersetzungsprodukte lassen sich nach ihrem Lösungsvermögen in eine rein „hydrophobe Komponente", einen in saurem Milieu „lipoidlöslichen" Anteil und mehrere rein hydrophile Stoffe einteilen. Beachtenswert ist, daß man beim Bestrahlen von alkalisch gepufferten wäßrigen Neutralrotlösungen Produkte nachweisen kann, die sich im elektrischen Feld abweichend verhalten. Die unterschiedliche Sauerstoffspannung in wäßrigen und organischen Medien mag dafür mitbestimmend sein, da die primär gebildeten Komponenten im kurzwelligen Licht bei Sauerstoffgegenwart leicht weiter zu farblosen Verbindungen abgebaut werden. Die „hydrophobe Komponente" läßt sich bei einer Strahleneinwirkung sowohl auf wäßrige als auch auf organische Lösungen nachweisen, desgleichen entsteht in beiden Fällen ein im sauren pH-Bereich lipoidlöslicher Anteil.

Es ist schon darauf hingewiesen worden, daß der Nachweis von je nach dem Charakter des Lösungsmittels verschiedenen Zersetzungsprodukten auch für die Deutung der bei Vitalfärbung gemachten Beobachtungen wichtig sein kann, da in der Zelle ebenfalls unterschiedliche Speicherorte für den Farbstoff vorliegen.

Wie meist angenommen wird (Drawert 1940, 1948, 1956; Strugger 1940, 1949; vgl. auch Höfler 1947, 1948, 1949), beruht die Fluorochromierung des Plasmas bei einer Neutralrotfärbung auf einer Anreicherung der undissoziierten Farbbase in lipoiden Phasen des Protoplasten. Die Fluoreszenz entspricht einer in neutralen hydrophoben Medien ausgeschüttelten Neutralrotlösung.

Bei der Bestrahlung von neutralrothaltigem Toluol oder Benzol erfolgt sehr bald ein Farbumschlag von Gelb nach Rot, der die Ausfällung der sauren Produkte anzeigt. Dabei ist gleichzeitig in dem Maße, wie die Basenmoleküle zerstört werden, eine erhebliche Fluoreszenzverminderung festzustellen.

Die Plasmafluoreszenz nimmt während der mikroskopischen Beobachtung dagegen nicht ab, sondern wird durch die Strahleneinwirkung sogar zuerst noch verstärkt (Drawert und Metzner 1956). Beim Bestrahlen einer gefärbten Benzol- oder Toluollösung in der Küvette, auch beim Beobachten eines Tropfens auf dem Objektträger oder eines Toluol-Gelatine-Modells (S. 548), ist dieser Effekt nicht nachzuweisen. Eine begründete Erklärung für die Fluoreszenzverstärkung lebender Protoplasten kann noch nicht gegeben werden. Erst nach sehr langen Einwirkungszeiten von 30 bis 60 Minuten tritt die Plasmafluoreszenz zurück, während die Vakuole unvermindert gelb aufleuchtet. Zu diesem Zeitpunkt zeigt das Plasma aber schon eine starke Schädigung, wie die Rotfärbung besonders der Plasmazwickel im Hellfeld zu erkennen gibt.

Im Modellversuch werden die grün fluoreszierenden Zwischenprodukte bei weiterer Bestrahlung bis zu farb- und fluoreszenzlosen Verbindungen abgebaut. Bei der Beobachtung von angefärbten Zwiebel-Oberepidermiszellen wird jedoch kein Nachlassen der sekundären Vakuolenfluoreszenz bemerkt. Dies ist auch nicht zu erwarten, da infolge des großen Speichervermögens der Zelle stets neue Basenmoleküle zur Verfügung stehen dürften. Außerdem wird im Innern der Zelle die Strahlenintensität durch die Membran — hier besonders durch Wachs- und Kutinschichten (Wuhrmann-Meyer 1941) — und durch das Plasma wesentlich abgeschwächt sein (Glubrecht 1956), so daß innerhalb nicht letaler Einwirkungs- und Beobachtungszeiten auch keine völlige Zerstörung des aufgenommenen Neutralrots stattfindet. Drawert und Metzner (1956) zeigten, daß auch bei einer reinen Membranfärbung an *Allium*-OE-Zellen in sauren Farbpuffern (pH 3—4) eine grünliche Vakuolenfluoreszenz durch die Strahleneinwirkung ausgelöst wird. Diese wichtige Beobachtung kann bestätigt werden. Auf Grund der intensiven Fluoreszenz der sauren Zersetzungsprodukte ist somit durch die Bestrahlung ein Mittel gegeben, auch geringste Konzentrationen an frei gelösten Basenmolekülen nachzuweisen. Allerdings müssen wir dabei beachten, daß möglicherweise auch saure, hydrophile Komponenten erst sekundär aus dem Plasma in die Vakuole ausgeschieden werden. Das Auftreten der grünen Zellsaftfluoreszenz ist immer erst geraume Zeit später zu beobachten, nachdem das Plasma schon die intensive gelbgrüne Fluoreszenz angenommen hat. Ein Übertritt hängt von der Durchlässigkeit der inneren Plasmagrenzschicht ab. Bei den „vollen" Unterepidermiszellen der Zwiebel, die den Farbstoff wahrscheinlich in gebundener, also für UV-Strahlen wohl nur schwer angreifbarer Form speichern (Kinzel 1958), wird aber keine sekundäre Zellsaftfluoreszenz beobachtet (Toth 1952), obwohl eine Fluoreszenzverstärkung des Plasmas (Drawert und Metzner 1956) auch hier auf eine Strahlenreaktion schließen läßt.

Es erschien reizvoll, das weitere Verhalten der gebildeten anionischen Komponenten in der Zelle zu verfolgen. Obwohl die Veränderung des Farbstoffes sehr schnell erfolgt, die Strahleneinwirkung also nur kurzfristig ist, macht sich doch nach einiger Zeit eine starke Schädigung der Zellen bemerkbar. Werden die Zellen dagegen im ungefärbten Zustand bestrahlt, so erweisen sie sich auch nach relativ langer Einwirkungszeit als sehr resistent. Bei den gefärbten Zellen ist deshalb auch mit einem „photodynamischen Effekt" des belichteten Farbstoffes zu rechnen. Zum anderen können auch die gebildeten sauren Produkte einen schädigenden Einfluß ausüben, etwa in dem Sinne, daß im Vergleich zu den Modellversuchen in den lipoiden Phasen des Plasmas Ausfällungen auftreten.

Werden die in alkalischem Puffer gefärbten und bestrahlten Objekte in ein saures Medium übertragen, so wandert in der bekannten Weise der unveränderte Farbstoff aus der Vakuole und dem Plasma aus und wird in der Membran festgelegt. Die gelbe Fluoreszenz der Vakuole bleibt erhalten, auch das Plasma wird nicht völlig entfärbt (lipophile Zersetzungskomponenten?). Aber dieser Eingriff, der bei einer unbestrahlten Zelle

leicht durchgeführt werden kann, erweist sich hier als so stark schädigend, daß keine Gewähr für die volle Vitalität der Zelle mehr gegeben ist.

Die Verhältnisse bei den „leeren" Oberepidermiszellen ermöglichen in Verbindung mit der Feststellung, daß nur Basenmoleküle zu grün fluoreszierenden Verbindungen abgebaut werden, einige allgemeine Betrachtungen über den Aufnahmeprozeß basischer Vitalfarbstoffe anzuschließen.

Durch die obigen Befunde wird die Annahme Struggers (1940) unterstützt, daß auch aus sauren Lösungen der Farbstoff in geringem Maße von der Zelle aufgenommen wird. In der Vakuole müßte dann das Neutralrot aber wenigstens teilweise als ungeladenes Molekül vorliegen und einem der Wasserstoffionenkonzentration entsprechenden Dissoziationsgleichgewicht zufolge stets neues, für Strahlen angreifbares Material zur Verfügung stehen.

Nach mikrospektrographischen Messungen von Bartels und Schwantes (1957) ist bei Zwiebel-OE-Zellen eine Farbstoffaufnahme in die Vakuole von pH 5,0 an nachweisbar. Der Speicherungsgrad in Abhängigkeit von der Azidität der gebotenen Farblösung weist deutlich einen stufenförmigen Verlauf auf. Die Autoren vergleichen die Neutralrotaufnahme mit dem Anteil der bei den entsprechenden pH-Werten vorliegenden Basenmoleküle und diskutieren neben einem rein osmotischen Aufnahmeprozeß in starkem Maße die Beteiligung nichtosmotischer und metaosmotischer Vorgänge im Sinne von Bogen und Prell (1953) für die beiden prototropen Formen des einfach positiv geladenen Neutralrotkations. Dafür spricht (S. 9), „daß die gemessene Stufe mit dem Existenzbereich des Molekülions NR^{+}_{I} zusammenfällt, und zum anderen, daß der Kurvenabschnitt im Alkalischen mit der Konzentration undissoziierter Moleküle eine gute Übereinstimmung zeigt, ferner jedoch auch in gewisser Weise die verschiedene Zeitabhängigkeit der Farbstoffaufnahme bei pH 6,75 und pH 9,6. Die Farbstoffaufnahme bei pH 6,75 erfolgt nicht so viel langsamer, wie es die bei diesem pH-Wert wesentlich geringere Außenkonzentration undissoziierter NR-Moleküle erwarten lassen sollte."

Wie die Abb. 2 und 3 der genannten Arbeit zeigen, sinkt der Anteil an ungeladenen Basenmolekülen in Pufferlösungen zwischen pH 8 und 6,5 rasch ab. Damit ist aber keineswegs gesagt, daß nicht auch aus Lösungen höherer Azidität Neutralrot-Moleküle in geringer Menge ins Plasma und in die Vakuole aufgenommen werden. So berichten Drawert und Metzner (1956) von einer orangegelben Plasmafluoreszenz bei pH 5, während im Hellfeld nur eine reine Membranfärbung zu beobachten ist. Die Tatsache, daß man auch bei niedrigen pH-Werten der Außenlösung durch kurzwellige Strahlen eine sekundäre Vakuolenfluoreszenz erzielen kann, spricht ebenfalls gegen die Annahme einer Kationenpermeabilität; man müßte sonst fordern, daß die in die Zelle gelangten Neutralrotkationen in der Vakuole wieder zu undissoziierten Molekülen zusammentreten.

Im Ausschüttelungsversuch mit Benzol oder Toluol läßt sich aber gleichfalls eine Fluoreszenz der organischen Phase auch noch bei starker saurer Reaktion der wäßrigen Phase beobachten. Der Grad der Lipoidlöslichkeit eines Farbstoffes braucht nicht in direktem Zusammenhang mit dem Verlauf

seiner Dissoziationskurve bzw. dem bei einem bestimmten pH-Wert vorhandenen Anteil an ungeladenen Molekülen zu stehen, wie die weiteren Ausführungen verdeutlichen sollen. Dies scheint bei den Untersuchungen von Bartels und Schwantes nicht genügend beachtet worden zu sein.

Bei den Angaben über Ausschüttelungsversuche von Vitalfarbstoffen, die sich in der Literatur finden, ist die Höhe der Lipoidlöslichkeit meist rein visuell abgeschätzt und die relative Intensität dann durch eine verschiedene Anzahl von Kreuzen wiedergegeben worden. Nun ist es aber schwer, bei den meist intensiv leuchtenden und häufig auch fluoreszierenden Farben genauere Aussagen zu machen. Eine exakt photometrische Bestimmung erschien daher wünschenswert.

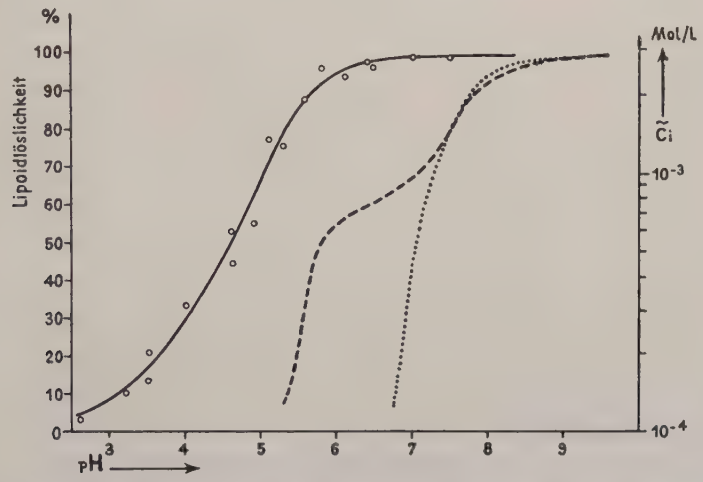

Abb. 5. Vergleich der Verteilung von Neutralrot zwischen einer wäßrigen Phase und Benzol mit der Neutralrotaufnahme in die Vakuole einer Oberepidermiszelle von *Allium cepa* bei verschiedenen pH-Werten. Linke Ordinate: Löslichkeit in Benzol = . Rechte Ordinate: Neutralrotkonzentration *Ci* in der Vakuole bei einer gebotenen Außenkonzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter = — — — und Konzentration der undissoziierten Farbbasenmoleküle, multipliziert mit dem willkürlich gewählten Faktor 27 = ... (Die letzten beiden Kurven sind entnommen aus Bartels und Schwantes, 1957, Abb. 5.)

Eine Komplizierung, wie sie die Konzentrationsbestimmung wäßriger Farbstofflösungen durch die Assoziationsbildung verursacht, kann hierbei ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen wurden mit dem Kompensationsphotometer von Leitz vorgenommen. Zur Ausschüttelung diente Benzol, die Adsorptionsbestimmung erfolgte durch ein Grünfilter von 510 mμ. Die Meßpunkte sind Mittelwerte von je 5 Parallelansätzen mit jeweils 10 Ablesungen. Die Konzentration der wäßrigen Farbstofflösungen ist hierbei in weiten Grenzen ohne Bedeutung, da sich in jedem Fall ein Verteilungsgleichgewicht einstellt. Es muß aber beachtet werden, daß das maximale Lösungsvermögen des Benzols nicht überschritten wird; zur Darstellung kann bei völliger Entfärbung der wäßrigen Phase die Lipoidlöslichkeit dann = 100% gesetzt werden.

Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt (linke Ordinate). Zum Vergleich ist die von Bartels und Schwantes (1957, Abb. 3) wiedergegebene Kurve der pH-Abhängigkeit der Neutralrotaufnahme in die Vakuole eingezeichnet, ebenso die Konzentration undissoziierter Basenmoleküle. Zur Einpassung wurde dabei die maximale Farbstoffaufnahme bzw. die Konzentration der Basenmoleküle = 100% gesetzt (rechte Ordinate).

Der Grad der Lipoidlöslichkeit läßt sich nun nicht ohne weiteres mit der direkten Konzentrationsangabe des in die Vakuole aufgenommenen Farbstoffes vergleichen. Die Aziditätsabhängigkeit der beiden Vorgänge zeigt

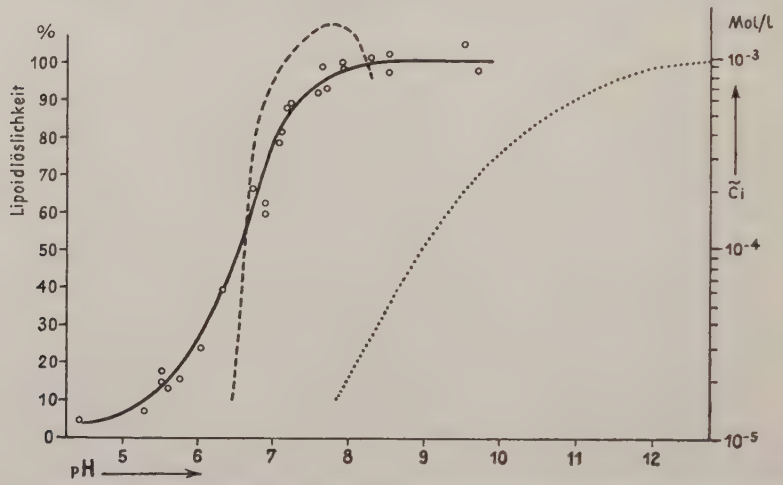

Abb. 6. Vergleich der Verteilung von Akridinorange zwischen einer wäßrigen Phase und Benzol mit der Akridinorangeaufnahme in die Vakuole einer Oberepidermiszelle von *Allium cepa* bei verschiedenen pH-Werten. Linke Ordinate: Löslichkeit in Benzol = ———. Rechte Ordinate: Akridinorangekonzentration $\tilde{C}i$ in der Vakuole = — — — und Dissoziationskurve für Akridinorange nach Zanker = ... (Die letzten beiden Kurven sind entnommen aus Bartels und Schwantes 1955, Abb. 9a.)

jedoch, daß die Löslichkeit des Neutralrots in einer lipophilen Phase wesentlich größer ist, als dem in wäßriger Lösung bei einem bestimmten pH-Wert vorliegenden Anteil an undissoziierten Molekülen entspricht, da sich bei genügender Pufferung der Farbstofflösung sofort wieder das Dissoziationsgleichgewicht einstellt und neue Basenmoleküle in dem Maße entstehen, wie sie der wäßrigen Phase entzogen werden.

In der gleichen Weise wurden die Verteilung zwischen einer hydrophilen und einer hydrophoben Phase für das Akridinorange und das Thionin bestimmt (Abb. 6 und 7) und zum Vergleich wiederum die von Bartels (1954) bzw. Bartels und Schwantes (1955, Abb. 9) gemessenen Kurven über die Aufnahme der Farbstoffe in die Vakuole nebst den von den Autoren wiedergegebenen Dissoziationskurven für Thionin und Akridinorange (Zanker 1952) eingezeichnet.

Bartels und Schwantes (1955, 1957) diskutieren auf Grund ihrer Messungen über die Aufnahme von Akridinorange, Thionin und Neutralrot

hauptsächlich die unterschiedlichen Speicherungsverhältnisse der Farbstoffe in der sogenannten „leeren" Vakuole. Nach den Angaben folgen das Thionin- und das Neutralrot-Basen-Molekül in bezug auf die pH-Abhängigkeit der Aufnahme und Speicherung streng ihren Dissoziationskurven. Das Speichermaximum liegt bei beiden Farbstoffen etwa 2 pH-Einheiten oberhalb ihrer p_K-Werte, die für Neutralrot zu 7.38 (Bartels 1956 b) und für Thionin zu 11,3 bestimmt wurden. Dies Verhalten stimmt mit den von Kinzel (1955) theoretisch berechneten Werten überein.

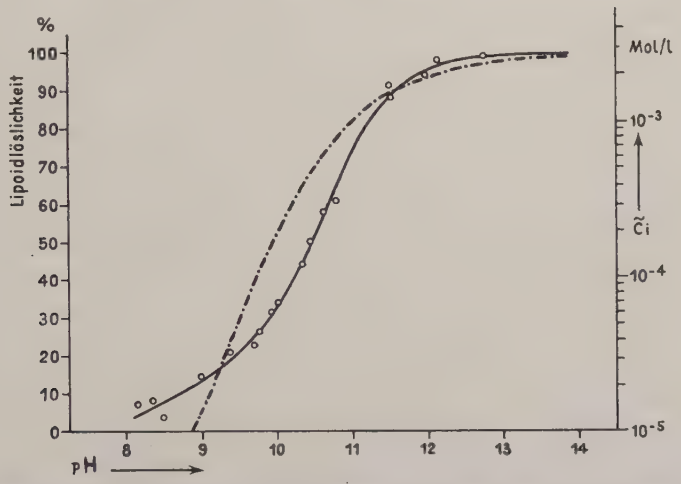

Abb. 7. Vergleich der Verteilung von Thionin zwischen einer wäßrigen Phase und Benzol mit der Thioninaufnahme in die Vakuole einer Oberepidermiszelle von *Allium cepa* bei verschiedenen pH-Werten. Linke Ordinate: Löslichkeit in Benzol = ———. Rechte Ordinate: Thioninkonzentration $\tilde{C}i$ in der Vakuole und Außenkonzentration an undissoziierten Thionin-Molekülen = —·—. Die Aufnahme des Thionins folgt streng der Dissoziationskurve (die letzte Kurve ist entnommen aus Bartels und Schwantes 1955, Abb. 9).

Beim Akridinorange wird eine maximale Farbstoffaufnahme dagegen schon 3 pH-Einheiten unterhalb des von Zanker (1952) gemessenen p_K-Wertes von 10,6, also bei pH 7.5, erreicht. Eine Erklärung für das abweichende Verhalten und eine Theorie des Aufnahmemechanismus wird von Bartels (1954) nicht gegeben.

Wie Bartels und Schwantes (1955) anführen, sind nach Untersuchungen von Drawert und Strugger (1938) und Rabinowitsch und Epstein (1941) ähnliche Verhältnisse auch beim Methylenblau anzunehmen. Die Stoffaufnahme ist nicht der Dissoziationskurve proportional, sondern setzt bereits 1—2 pH-Einheiten unterhalb des wahrscheinlichen p_K-Wertes von 13 ein.

Die in Abb. 5—7 wiedergegebene Verteilung der Farbstoffe zwischen einer hydrophoben und einer hydrophilen Phase in Abhängigkeit von der Azidität kann nun nicht ohne weiteres eine Erklärung für die unterschiedlichen Speicherungsverhältnisse in der Vakuole geben, läßt aber eine Deutung über den möglichen Aufnahmevorgang zu.

In Übereinstimmung mit Kinzel (1938 b) soll darauf hingewiesen werden, daß die aufgezeigten Kurven auch ohne Schwierigkeiten die Annahme einer Farbstoffpermeation durch das Plasma allein auf Grund der Lipoidlöslichkeit zulassen, ohne daß nichtosmotische oder metaosmotische Prozesse gefordert zu werden brauchen.

Ebenso wie die Aufnahme in die lebende Zelle steht auch die Lipoidlöslichkeit nicht in direktem Zusammenhang mit dem Verlauf der Dissoziationskurven bzw. den p_K-Werten der untersuchten Farbstoffe.

Beim Akridinorange ist die gleiche pH-Abhängigkeit der Vakuolenfärbung wie auch der Lipoidlöslichkeit festzustellen; beide Kurven steigen zwischen pH 6 und 7 steil an. Im Gegensatz zu Strugger (1940, 1949) und Kölbel (1947) erklärt besonders Höfler (1947, 1948, 1949) die Farbstoffaufnahme ins Plasma und in die Vakuole ausschließlich auf Grund der Lipoidlöslichkeit.

Die Verhältnisse beim Neutralrot zeigen, daß auch aus sauren Lösungen, in denen der Farbstoff fast völlig, aber nicht restlos dissoziiert vorliegt, eine Aufnahme von Basenmolekülen denkbar ist. Damit ist über die Möglichkeiten einer Speicherung in der Zelle nichts ausgesagt. Die pH-Abhängigkeit einer Vakuolenfärbung wird in starkem Maße durch den jeweiligen Speichermechanismus bedingt. Dies beweist das unterschiedliche Verhalten der beiden Zwiebelepidermen. Bei den „vollen" Unterepidermiszellen kann eine Zellsaftfärbung bereits nachgewiesen werden, während die Zellen der oberen Epidermis bei demselben pH-Wert der Außenlösung nur eine reine Membranfärbung erkennen lassen.

Die Aufnahme des Thionins folgt, wie Bartels und Schwantes (1955) angeben, streng der Dissoziationskurve, d. h. dem Anteil an undissoziiert vorliegenden [Thio]-Molekülen (Iminobase), die wiederum in einem Gleichgewicht mit [$Thio^+$ OH^{--}]-Molekülen (nicht ionisiertem Thioninhydroxyd) stehen (Epstein, Karush und Rabinowitch 1941). Abb. 7 zeigt, daß die Verteilung des Farbstoffes zwischen Benzol und wäßrigen Pufferlösungen ebenfalls dieser Kurve entspricht. Wie aus einem Vergleich mit den anderen untersuchten Stoffen hervorgeht, kann dies aber als reine Zufälligkeit bzw. typische Eigenschaft des Thionins angesehen werden. Dafür spricht auch die Größe der maximalen Löslichkeit des Farbstoffes in Benzol, wie gleich näher erörtert werden soll.

Zu den Ausschüttelungsversuchen mit Thionin ist noch zu sagen, daß nach dem Durchschütteln eine starke Erhöhung der Azidität der Pufferlösungen festgestellt werden kann. Die Kapazität des Puffers muß gegenüber den anderen Farbstoffen wesentlich erhöht werden, wenn der pH-Wert nicht absinken soll. Bei den Versuchen wurden deshalb die pH-Werte stets vor und nach dem Ausschütteln kontrolliert. Die Abnahme der Hydroxylionen-Konzentration deutet darauf hin, daß nicht die Iminobase, wenigstens nicht allein, sondern das undissoziierte Thioninhydroxyd in die hydrophobe Phase übergeht. Diese Erscheinung könnte auch für das abweichende Speicherungsverhalten des Thionins (Bartels und Schwantes 1955) Bedeutung haben (vergleiche auch Kinzel 1954). Auf die Fragen der Speicherung soll hier aber nicht näher eingegangen werden.

Bartels und Schwantes (1957) weisen darauf hin, daß die Speicherung der drei Farbstoffe stark von der Art der Substitution beeinflußt zu sein scheint. Über die Aufnahmegeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Anzahl der vorhandenen Aminogruppen berichtet Bazin (1946). Bei den hier untersuchten Stoffen ergibt sich eine Reihe mit abnehmender Zahl der Methylgruppen vom Akridinorange über das Neutralrot zum Thionin. Methylgruppen erhöhen im allgemeinen die Hydrophobie der Verbindungen.

Wie sich feststellen ließ, nimmt nun auch in der gleichen Weise die absolute Lipoidlöslichkeit dieser Stoffe ab. Genauere Angaben liegen anscheinend hierüber noch nicht vor. Deshalb wurden hochkonzentrierte Lösungen der drei Farbstoffe stark alkalisch gepuffert (n/10 NaOH), mit Benzol ausgeschüttelt und die in 25 cm^3 enthaltene Substanzmenge nach Verdampfen

Tab. 2. *Gelöste Farbstoffmenge in 25 cm^3 Benzol (20—23°)*

Akridinorange	Neutralrot	Thionin
129,9 mg	8,7 mg	1,0 mg
121,2	7,2	0,8
72,4	10,9	1,1
116,5	10,0	1,0
170,0*)	9,3	1,6
121,1	9,7	1,0
139,8	10,5	0,8
110, mg	7,2 mg	1,1 mg
M.: 122,6 mg $\equiv 1{,}8 \cdot 10^{-2}$ mol/l	M.: 9,2 mg $\equiv 1{,}4 \cdot 10^{-3}$ m l/l	M.: 1,0 mg $\equiv 1{,}8 \cdot 10^{-4}$ mol/l

* Die Lösung zeigt bereits eine Trübung.

des Lösungsmittels und Trocknung bei 100° gewogen (Tab. 2). Die einzelnen Gewichtsangaben sind Mittelwerte von jeweils 4 Parallelbestimmungen eines Ausschüttelungsansatzes.

Die Streuung der Werte ist hauptsächlich auf eine unterschiedliche Durchmischung zurückzuführen. Zu einer genaueren Bestimmung müssen die Ansätze in größerem Maße wiederholt werden. Aber diese orientierenden Proben zeigen bereits deutlich die Unterschiede. So verhält sich die Löslichkeit des Akridinorange, Neutralrots und Thionins etwa wie 100 : 10 : 1.

Die Konzentration in der abgetrennten organischen Phase läßt sich durch Einengen noch erhöhen, ohne daß es zu Ausscheidungen kommt. Jedoch wurden stets nur frisch ausgeschüttelte Lösungen verwendet, da besonders das Thionin bei Benutzung normaler Glasgefäße schnell Zersetzungserscheinungen zeigt (Epstein, Karush und Rabinowitch 1941).

Die Größe der maximalen Lipoidlöslichkeit steht in guter Übereinstimmung mit der Verteilung der Farbstoffe zwischen einer hydrophilen und hydrophoben Phase in Abhängigkeit von der Azidität. Interessant ist noch ein Vergleich der in der Literatur angegebenen p_K-Werte mit den pH-Werten, bei denen sich ein Verteilungskoeffizient von 1 einstellt. Beim Akridin-

orange liegt dieser Wert 4, beim Neutralrot ungefähr 3 pH-Einheiten unterhalb des p_K, beim Thionin etwa eine pH-Einheit.

Bartels und Schwantes (1955) weisen darauf hin, daß in der Aufnahme und Speicherung von Akridinorange und Thionin erhebliche quantitative Unterschiede bestehen, obwohl die Dissoziationskonstanten dieser beiden Stoffe kaum voneinander abweichen. So wird der Umschlagspunkt von einer Membran- zu einer Vakuolenfärbung ruhender Zwiebeln von Strugger (1940) für Akridinorange bei pH 6,5, von Drawert (1940) für Thionin bei pH 8,5 –9,5 (Bartels und Schwantes, 1955: pH 10,1) ermittelt. Die Befunde über die unterschiedliche Affinität der beiden Farbstoffe zu lipophilen Lösungsmitteln können als eine plausible Erklärung dieser Erscheinung angesehen werden.

Es ist nun natürlich nicht gesagt, daß die Löslichkeit der ungeladenen Farbstoffbasen in Benzol als Modellsubstanz ohne weiteres mit dem Lösungsvermögen der lipoiden Phasen des Plasmas gleichgesetzt werden kann. Vor allem müßten noch andere hydrophobe Medien, native Öle usw., wie sie vielfach mit Erfolg zu Modellversuchen benutzt worden sind, in Verbindung mit weiteren Farbstoffen für diese Zwecke herangezogen werden, ehe man eine gesicherte Aussage machen kann.

Die Untersuchungen zeigen jedoch deutlich, daß die Aufnahme der drei betrachteten Farbstoffe in die Zelle nur innerhalb solcher cH-Bereiche erfolgt, bei denen sich im Ausschüttelungsversuch das Verteilungsgleichgewicht in starkem Maße zur lipoiden Phase neigt.

B. Versuche mit reduziertem Neutralrot

a) *Darstellung und Eigenschaften*

Bei Untersuchungen über die Natur der sekundären grünen Vakuolenfluoreszenz, die unter der Bestrahlung auftritt, führten Drawert und Metzner (1956) vergleichsweise auch Versuche mit reduziertem Neutralrot durch. Sie konnten zeigen, daß das Bestrahlungsprodukt nicht mit der reduzierten Form des Farbstoffes identisch ist, da dieses im elektrischen Feld zur Kathode wandert. „Andererseits scheint aber zwischen beiden fluoreszierenden Komponenten doch eine Beziehung zu bestehen, da in den bestrahlten reoxydierten Lösungen die zur Kathode wandernde fluoreszierende Komponente etwa in dem Maße verschwindet, wie die zur Anode wandernde entsteht."

Diese Verhältnisse sollen noch näher analysiert werden. Dies scheint besonders wichtig im Hinblick auf die Untersuchungen von Kiermayer (1955, 1956[1]), der feststellte, daß das Neutralrot, trotz seinem hohen negativen Redoxpotential (rH 4—7,5), in bestimmten Algenzellen unter Luftabschluß reduziert werden kann.

[1] Zu der Arbeit von Kiermayer (1956) muß erwähnt werden, daß wohl durch ein Versehen die Bezeichnungen „voller" und „leerer" Zellsaft verwechselt worden sind. Um weitere Irrtümer zu verhindern, möchte ich hierauf hinweisen, da derselbe Fehler auch in einem Referat von F. Weber (Wetzlar) in der Z. f. wiss. Mikr. 64, 62 (1958) erscheint.

Wesentlich bei allen Vitalfärbeversuchen ist, von chemisch absolut reinen Substanzen auszugehen. Deshalb benutzte ich für meine Untersuchungen abweichend von den genannten Autoren und Miličić (1957), die das mit Rongalit reduzierte Neutralrot direkt verwendeten, das reine „Fluoreszent X" nach den Angaben von Clark und Perkins (1932). Zur Reindarstellung wird eine konzentrierte Farblösung mit Natriumdithionit im Überschuß versetzt und zu der reduzierten Lösung Kalilauge gegeben. Das Fluoreszent X fällt in langen gelben Nadeln aus, die nach gründlichem Waschen mit destilliertem Wasser getrocknet werden. Das trockene gelbliche Pulver ist, wie auch Lewis (1935) beschreibt, jahrelang haltbar. In Wasser ist der Farbstoff nur zu einem geringen Teil löslich, die Lösung zeigt aber trotzdem eine kräftige Gelbfärbung, die schon im diffusen Tageslicht von einer intensiven grüngelben Fluoreszenz überlagert wird.

In der Elektrophoreseapparatur wandert Fluoreszent X stets zur Kathode, im sauren Gebiet wesentlich stärker als im alkalischen. Auch bei pH 12 trägt der Farbstoff noch eine Ladung. Nach Angaben von Kiermayer (1956) läßt er sich bei keinem pH-Wert mit Benzol ausschütteln.

Die Wanderung ist im allgemeinen wesentlich schneller als die des oxydierten Farbstoffes, genaue Angaben hierüber können nicht gegeben werden, da im sauren Pufferbereich unter pH 3 rasch eine Umfärbung zum Neutralrot stattfindet.

b) Vitalfärbung mit „Fluoreszent X"

Kiermayer (1955, 1956) führte hauptsächlich Färbungen an Algenzellen durch, daneben vergleichsweise auch an Zwiebelzellen. Er fand in der Anwendung von reduziertem Neutralrot eine gute Methode, um „leere" und „volle" Zellsäfte zu unterscheiden, wobei sich auch noch Unterschiede innerhalb dieser beiden Gruppen auf Grund metachromatischer Farbtöne zeigten. Miličić (1957) führte die Versuche an vollen Zellsäften von 11 höheren Pflanzen weiter fort. Drawert und Metzner (1956) benutzten weitgehend reoxydiertes Neutralrot. Dabei bestand die Gefahr, daß zwei verschiedene Prozesse sich bei der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung überlagerten: 1. die Anfärbung mit noch nicht reoxydiertem Fluoreszent X und dessen Verhalten während der Strahleneinwirkung, 2. eine normale Neutralrotfärbung, die den von Strugger (1940) beschriebenen Fluoreszenzumschlag zeigt. So schien es nötig, noch einmal eine genaue Analyse der Vitalfärbung mit dem reinen Fluoreszent X an den Zwiebel-Oberepidermiszellen wiederzugeben. Die Färbezeiten betrugen 10 Minuten bis zu einer Stunde. Verwendet wurden die üblichen Phosphatpuffer.

pH 3,5: Im Hellfeld ist nur eine schwache Gelbfärbung der Membran zu beobachten, die im Blaulicht intensiv gelb fluoresziert. Plasma, Kern und Vakuole sind fluoreszenzfrei, soweit es sich durch die starke Membranfluoreszenz beurteilen läßt.

pH 4,8: Das Bild entspricht dem von pH 3,5.

pH 6,2: Die intensive Membranfluoreszenz ist unvermindert, gelegentlich leuchten auch die Vakuolen gelb durch, was besonders für Wundrandzellen zutrifft. Das Bild ist schwer analysierbar, da die Membran alles überstrahlt. Ein Teil des Farbstoffes wird ausgewaschen, so daß die Pufferlösung nach und nach stärker fluoresziert. Nach Plasmolyse mit KNO_3 erscheint der gelbe Farbstoff auch im extraplasmatischen Raum.

pH 6,8: Im Hellfeld erscheint das ganze Epidermishäutchen schwach gelblich. Im Blaulicht fluoreszieren Membran und Vakuole gleichermaßen rein gelb. Das Plasma ist ungefärbt. Während der Beobachtung tritt ein Nachlassen besonders der Vakuolenfluoreszenz auf, während die Membranfärbung unverändert bleibt bzw. sogar an Intensität gewinnt. Dies kann aber nicht entschieden werden, da es sich möglicherweise um einen rein optischen Effekt handelt, indem nur der Kontrast erhöht wird.

pH 8,5: Hier zeigen die Vakuolen eine intensive gelbe Fluoreszenz. Die Membran leuchtet nur noch ganz schwach auf. Während der Beobachtung wird die Vakuolenfluoreszenz stark vermindert bzw. auch völlig gelöscht. Die Zeit ist von der Dauer der Anfärbung (15 Sekunden bis 5 Minuten), also vom Grad der Farbstoffspeicherung, abhängig. Wird das Epidermishäutchen für 15 Sekunden in dem Farbpuffer belassen, ist im allgemeinen nur eine sehr schwache Vakuolenfluoreszenz zu beobachten, die Wundränder speichern den Farbstoff etwas stärker, aber mit der gleichen gelben Fluoreszenz. Bei noch kürzeren Färbezeiten läßt sich das Fluoreszent X nur in den Wundrandzellen nachweisen. Farbunterschiede, wie sie das Neutralrot im Hellfeld zwischen dem zentralen Zellbereich des Epidermishäutchens und den gereizten Zellen des Schnittrandes zeigt, können hier im Blaulicht nicht nachgewiesen werden. Im gewöhnlichen Licht erscheinen die Wundränder stärker gelb bis bräunlich tingiert. Während aber die Fluoreszenz bei den ungereizten Zellen fast augenblicklich gelöscht wird, behalten die Wundrandzellen ihre Fluoreszenz länger bei, obwohl auch hier nach längerer Bestrahlung eine Abschwächung eintritt.

pH 10,5: Nur die Vakuole zeigt eine intensive gelbe Fluoreszenz, deren Löschung einmal von der Färbezeit abhängig ist, dann aber auch in hohem Maße von dem Alter des verwendeten Quecksilberbrenners. So machte sich nach ungefähr 30- bis 40stündiger Brenndauer ein starker Intensitätsabfall des Erregerlichtes bemerkbar.

Die Beobachtungen wurden mit der großen Fluoreszenzeinrichtung von Zeiss durchgeführt. Zur Kontrolle benutzte ich auch das Licht einer Kohlenbogenlampe (siehe unter „Methodik"). Damit wurde innerhalb normaler Beobachtungszeiten keine Fluoreszenzlöschung festgestellt.

c) *Modellversuche. Deutung der Ergebnisse*

Auch im Modellversuch läßt sich die Fluoreszenzlöschung beobachten, wenn eine wäßrige Farblösung für 30 bis 60 Minuten der Strahlenwirkung ausgesetzt wird. Sie tritt analog zu der Neutralrot-Zersetzung auch hier nur bei Sauerstoffgegenwart auf. Wird vorher ein Stickstoffstrom durch die Lösung geleitet, findet keinerlei Veränderung statt. Die Erscheinung der Fluoreszenzlöschung scheint nicht mit einer Reoxydation zum Neutralrot verbunden zu sein, denn die bestrahlte Lösung besitzt eine hell gelblichbraune Eigenfarbe. Ein roter Farbton tritt nicht auf. Allerdings muß beachtet werden, daß die Konzentration trotz der intensiven Fluoreszenz sehr gering ist.

Ähnliche Farbtöne erhält man, wenn eine desoxygenierte Fluoreszent-X-Lösung in einer Stickstoffatmosphäre mit sauerstofffreier Salzsäure versetzt wird. Das Fluoreszent X behält eine gelblichbraune Farbe, die Fluoreszenz verschwindet sofort, während an Luft augenblicklich ein Umschlag

nach Rot erfolgt. Die Farbtiefe ist davon abhängig, wieweit der Sauerstoff entfernt werden konnte.

Nach Drawert und Metzner (1956, S. 373, Abs. 4) entstehen bei der langsamen Reoxydation einer mit Natriumdithionit reduzierten Neutralrot-Lösung eine grün und eine weißgrün fluoreszierende Komponente, die sich chromatographisch nachweisen lassen. Um deren Ladungsverhältnisse kennen zu lernen, brachte ich ein entwickeltes eindimensionales Papierchromatogramm in die Elektrophoreseapparatur. Beide Farbflecke wanderten zur Anode (Abb. 8).

Zu den durch die Bestrahlung entstehenden Zersetzungsprodukten bestehen keine Beziehungen. Vom völlig reoxydierten Neutralrot konnten die beiden Komponenten mit Zellulosepulver getrennt werden. Eine Reingewinnung wurde jedoch nicht erzielt, da die Lösung sich nicht völlig von dem zugesetzten Reduktionsmittel befreien ließ. Sie hat eine gelbliche Farbe und zeigt weißlichgrüne Fluoreszenz. Vitalfluorochromierungen können hiermit durchgeführt werden. Wie auch bei anderen sauren Farbstoffen ist bei zunehmender Azidität der Pufferlösung eine verstärkte Speicherung im Plasma und Zellkern festzustellen. Durch die gleißend gelbe Fluoreszenz heben sich die feinsten Plasmastränge deutlich von der dunklen Vakuole ab. Die Färbung ist diffus, bestimmte Granula treten nicht hervor. Eine lebhafte Plasmaströmung deutet auf volle Vitalität der Zellen. Einzelne Wundrandzellen zeigen eine Aufquellung in den Zellzwickeln. Ein Nachlassen der Fluoreszenzintensität wird nicht beobachtet.

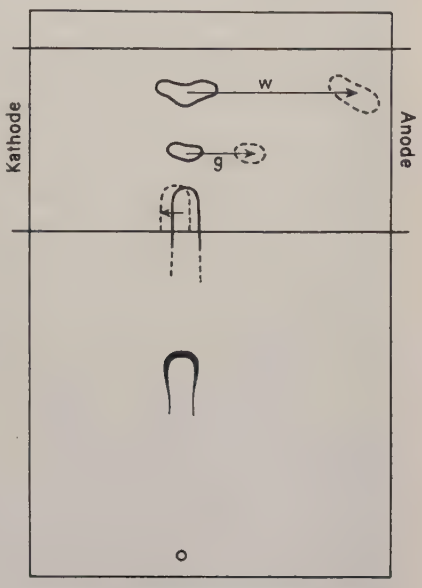

Abb. 8. Eindimensionales Papierchromatogramm einer reoxydierten Neutralrotlösung. Mit dem mittleren Teil wurde anschließend eine Elektrophorese durchgeführt. Phosphatpuffer pH 6,1; Laufzeit 7 Std., w = weißgrüne Fluoreszenz, g = grüne Fluoreszenz.

Mit Toluol, Benzol, Chloroform, Hexan lassen sich die Komponenten bei keinem pH-Wert ausschütteln, ebenso ist auch im stark sauren Gebiet die Wanderung im elektrischen Feld nicht merklich vermindert.

Um den Zusatz eines schwer entfernbaren Reduktionsmittels zu vermeiden, wurde auch mit Wasserstoff reduziert. Als Katalysator diente Palladium-Lösung nach Paal. Auffallend ist, daß sich nach Reoxydation die beiden sauren Komponenten nicht nachweisen ließen, ebensowenig nach Verwendung von Zink und Salzsäure. Es wird deshalb vermutet, daß es sich bei den beiden negativ geladenen Anteilen nur um ein Reaktionsprodukt des reduzierten Neutralrots mit dem Natriumdithionit handelt. Merkwürdig ist auch, daß der Anteil der sauren Komponenten stets ungefähr gleich war, unabhängig von der Menge des zugesetzten Reduktionsmittels. Dies könnte auf eine Verunreinigung des Neutralrots hinweisen, die sich bis jetzt chromatographisch nicht hat nachweisen lassen.

Die durchgeführten Untersuchungen können eine Erklärung für die von Drawert und Metzner (1956) mitgeteilten Befunde geben (S. 377, Abb. 5). In der

von den Autoren verwendeten reoxydierten Neutralrotlösung lag noch ein Teil des Farbstoffes in der reduzierten Form vor, der im elektrischen Feld zur Kathode wanderte. Durch die Bestrahlung der Lösung tritt mit der Fluoreszenzlöschung eine Veränderung des Farbstoffes ein, über die hier nichts ausgesagt werden kann. Gleichzeitig wird der als Base vorliegende Anteil des Neutralrots im kurzwelligen Licht photooxydativ zu grün fluoreszierenden sauren Zwischenprodukten abgebaut. Es handelt sich also um die Überlagerung von zwei vollkommen getrennten Vorgängen.

Der Aufnahmemechanismus für Fluoreszent X, der zu einer Speicherung des Farbstoffes in der Vakuole führt, war bisher unbekannt. Die Tatsache der starken elektrophoretischen Wanderung auch im alkalischen Bereich, ebenso die Angabe von Kiermayer (1955), daß reduziertes Neutralrot sich bei keinem pH-Wert in Benzol ausschütteln läßt, könnte für eine Ionenintrabilität sprechen. Dem steht aber in gewisser Weise entgegen, daß das Plasma stets fluoreszenzfrei bleibt. Selbst geringe Farbstoffmengen müßten bei der intensiven Fluoreszenz nachweisbar sein. So ist eine Fluoreszenz immer nur in der Vakuole nachzuweisen, wenn eine alkalische Farblösung erst während der Beobachtung zugegeben wird. Dasselbe ist der Fall, wenn man von plasmolysierten Zellen ausgeht und den Farbstoff in Zuckerlösung darbietet.

Ich wiederholte die Ausschüttelungsversuche mit Benzol und prüfte noch andere lipophile organische Medien auf ihr Lösungsvermögen sowohl für reduziertes Neutralrot als auch für das reine Fluoreszent X, da der Zusatz eines Reduktionsmittels für die Farbstoffverteilung von Bedeutung sein kann. Wird eine Neutralrotlösung 1 : 10.000 reduziert, so nimmt sie eine olivgrüne Farbe an. Nach Ausschüttelung mit Benzol bei pH 8.3 bleibt dieses farblos, auch die wäßrige Phase zeigt keine Farbaufhellung, die auf einen Farbstoffübertritt schließen läßt. Im UV-Licht zeigt das Benzol nur eine etwas verstärkte bläuliche Fluoreszenz (vgl. dazu auch S. 551 f.). Mit Wasser läßt sich wegen der geringen Löslichkeit nur eine hellgelbe Farblösung herstellen, die bei Pufferung auf pH 8 bis 9 noch etwas ausblaßt. Auch die Fluoreszenz wird verringert. Nach Clark und Perkins (1932) bildet sich dabei die farblose Leukobase. Nach Ausschüttelung mit Benzol ist die wäßrige Phase noch stärker aufgehellt, das Benzol farblos; höchstens ein ganz schwacher gelblicher Schimmer ist zu sehen, der aber auch auf geringe Wasserspuren zurückgeführt werden könnte. Um diese zu entfernen, wird die organische Phase durch ein dickes Papierfilter geschickt, das sich dabei gelb anfärbt. Die Fluoreszenz bleibt schwach hellblau. Wird das Benzol nun wieder mit destilliertem Wasser durchgeschüttelt, so zeigt diese eine gelbe Farbe und unter der Quarzlampe die bekannte intensive grüngelbe Fluoreszenz.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das stark fluoreszierende reduzierte Neutralrot in schwach alkalischen Lösungen in eine Leukoverbindung überführt wird. Die Tatsache, daß der Körper farblos ist und auch keine Fluoreszenz aufweist, ist der Grund dafür, daß die Lipoidlöslichkeit dieses Stoffes bis jetzt übersehen worden ist. Damit ist auch der Mechanismus der Farbstoffaufnahme in die

Zelle geklärt, und die Speicherung in den leeren Zellsäften der *Allium*-OE kann nach dem Prinzip der Ionenfalle (Höfler 1947) gedeutet werden entsprechend dem cH-Gefälle zwischen Außenlösung und Vakuole (Drawert 1948, 1956). Für die vollen Unterepidermen werden die gleichen Speichermechanismen gelten wie auch für das Neutralrot und andere basische Farbstoffe.

II. Untersuchungen mit Pyroninfarbstoffen

Der Einfluß von Licht und kurzwelligen UV-Strahlen auf gefärbte Körper ist schon vielfach Gegenstand von Untersuchungen gewesen, wobei die Frage nach der Lichtechtheit von Farbstoffen für die Technik von Bedeutung war. Meist handelt es sich dabei wohl um photooxydative Zerstörungen bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und eventuell auch Wasserdampf. Es können aber ebenso Reduktionen oder andere Reaktionen ein Ausbleichen bewirken. Ein Farbstoff, der in dieser Beziehung noch näher untersucht werden muß, ist das Pyronin.

Nachdem der Farbstoff früher vielfach zur Tingierung fixierter biologischer Objekte verwendet worden war, führte Drawert (1940) eine allgemeine Analyse der Farbstoffeigenschaften für Vitalfärbungen an Pflanzenzellen durch. Strugger (1941) beschreibt das Pyronin zum erstenmal als „zweifarbigen Fluoreszenzindikator" und betont seine Verwendungsmöglichkeit für chemische Titrationen wegen des engen Umschlagbereiches.

Im sauren und schwach alkalischen pH-Bereich liegt das rote, gelb fluoreszierende Kation vor, während sich im stark basischen Milieu über pH 10,5 die Farbbase ausbildet. Eine Veilfluoreszenz im Übergangsbereich wird dem undissoziierten Farbsalz zugeschrieben. Die Base besitzt ausgeprägte lipophile Eigenschaften, so daß sie sich fast quantitativ in organischen Lösungsmitteln anreichern läßt. Die Pyroninbase soll eine intensive ultramarinblaue Fluoreszenz zeigen. Ebenso gelingt es bei Vitalfärbungsversuchen an *Allium*-Oberepidermen, eine kräftige blaue Plasmafluoreszenz zu erzielen, womit lipophile Phasen des Protoplasten nachgewiesen werden können (siehe auch Strugger 1949). Perner (1952) bestätigt diese Angaben. Eine Vakuolenfärbung tritt im allgemeinen nicht ein.

Boerner (1950) verwendet Pyronin zu Fluorochromierungsstudien an der Säugerhaut. Ein altes Farbstoffpräparat von Grübler wird dazu benutzt, das in Lösung stärker dissoziiert vorliegen soll, da der Umschlagspunkt gegenüber den Angaben von Strugger weiter zur alkalischen Seite hin verschoben ist. Bevor der Farbstoff in die blaufluoreszierende Phase übergeht, ist ein deutlicher Intensitätsabfall der gelben Fluoreszenz zu bemerken. Ebenso wie beim Akridinorange werden auch beim Pyronin schwächere Konzentrationseffekte beschrieben (Boerner-Patzelt 1950).

In einer weiteren Arbeit von Boerner (1952) werden reine und gemischte Fettsubstanzen auf ihre Fluoreszenz geprüft. Beim Lezithin, das sowohl hydrophile als auch hydrophobe Gruppen enthält, sind je nach dem pH-Wert des Farbpuffers nach Pyroninbehandlung gelbe oder bläuliche Fluoreszenzfarben zu beobachten.

Sowohl an lebenden als auch an toten Zellen (Fixation mit HCl oder kurzfristige Behandlung mit Alkohol) und an einem angefärbten Gelatine-

Benzol-Modell findet Strugger eine starke Strahlenempfindlichkeit der blau fluoreszierenden Pyroninbase. Es „bewirkt eine UV-Bestrahlung sowohl am Modell als auch in der Zelle eine Änderung der in der lipophilen Phase gelösten Farbbase zum undissoziierten Farbsalz, welche dann in der Farbe der Kationen in beiden Fällen im Eiweißsystem gespeichert wird".

Am Gelatine-Benzol-Modell konnte Strugger zeigen, daß sich nach einer bestimmten Erholungszeit im Dunkeln die ursprüngliche Farbstoffverteilung einstellte. Die Benzoltröpfchen fluoreszierten wieder blau. Die Umwandlung der Farbbase zum Farbsalz oder -kation durch die UV-Strahlen müßte demnach ein reversibler Vorgang sein, der von der lebenden Zelle völlig unabhängig ist. Es liegt auch hier, ebenso wie beim Neutralrot, eine direkte Einwirkung der energiereichen Strahlung auf den Farbstoff vor. Die Verhältnisse sollen im folgenden näher untersucht werden.

A. Analyse des Pyronins

a) Vergleichende Untersuchungen über verschiedene Pyronin-Präparate

Drawert (1956) weist nachdrücklich darauf hin, wie wichtig es ist, bei der Verwendung von Farbstoffen für physiologische Versuche die Herkunft genau anzugeben. Am Beispiel des Pyronins wird durch chromatographische Analyse gezeigt, daß bei den verschiedenen Fabrikaten sowohl abweichende Stoffe vorliegen müssen als auch unterschiedliche Verunreinigungen oder Nebenkomponenten vorhanden sind. Hierauf haben auch Sibatani und Fukuda (1951) hingewiesen und gleichzeitig ein Reinigungsverfahren für Pyronine angegeben (Sibatani 1952). Diese Verunreinigungen können zur Erzielung bestimmter Vitalfärbungseffekte entscheidend beitragen. Andererseits können auch Präparate mit verschiedenen Handelsbezeichnungen weitgehend identisch sein (Drawert und Gutz 1953; Drawert 1955; Drawert und Metzner 1955; Mix 1958).

Es ist mir leider nicht gelungen, ein Präparat von Hollborn & Söhne (Leipzig) zu bekommen, das Drawert (1940) und Strugger (1941) für ihre Untersuchungen benutzten. Perner (1952) gibt keine Bezeichnung an. Deshalb schien es wesentlich, zuerst das Verhalten von Farbstoffen verschiedener Herkunft (s. S. 520) zu untersuchen und mit den Angaben der Autoren zu vergleichen.

Die Pyronine gehören zur Klasse der Xanthenfarbstoffe. Nach der Art der Substituenten der beiden symmetrischen Aminogruppen unterscheidet man ein Tetramethylderivat = Pyronin G (Syn. P. Y) und eine Tetraaethylverbindung = Pyronin B. Akridinrot gehört ebenfalls zu den Xanthenen und stellt ein niederes Homolog dar; es ist das symmetrische Dimethylaminoderivat und entsteht aus Pyronin G durch oxydative Abspaltung zweier Methylgruppen.

Die von Strugger (1941) angeführte Formel entspricht dem Pyronin G. Die Farbstoffe von Grübler-Chroma[1] bilden mit Alkalien einen hellroten Niederschlag,

[1] Nach freundlicher Auskunft der Fa. Chroma, Stuttgart-Untertürkheim, bestehen zwischen beiden Präparaten nur Unterschiede hinsichtlich des Reinheitsgrades; es handelt sich um die Tetramethylverbindung, das Farbsalz liegt als Chlorid vor.

Tab. 3. *Vergleich einiger Pyroninreaktionen mit Literaturangaben*
Die Angaben über Pyronin G und Pyronin B sind zusammengestellt aus den Farbstofftabellen von Schultz, 7. Aufl. 1931, Beiträgen im Beilstein, 4. Aufl., Bd. 18 (1931), und den Untersuchungen von Biehringer (1896).

Pyronin G	
in Alkohol:	rot, gelbe Fluoreszenz
in H_2O:	rot, gelbe Fluoreszenz
+ NaOH:	blaßroter Niederschlag
löslich in:	Alkohol, Aceton, Chloroform: rot, gelbe Fluoreszenz; Benzol, Schwefelkohlenstoff, Äther: gelb, ohne Fluoreszenz; Ligroin: rot, wird beim Erwärmen hellgelb
+ HCl:	hellorange Lösung
+ rauch. HCl:	braun, ohne Fluoreszenz
+ H_2SO_4:	rotgelbe Lösung
Pyronin B	
in Alkohol:	rot, rötlichgelbe Fluoreszenz
in H_2O:	rot, rötlichgelbe Fluoreszenz. Blaustichiger als Pyronin G
+ NaOH:	blaßroter Niederschlag
+ HCl:	helloranger Niederschlag
+ H_2SO_4:	rotgelbe Lösung
Pyronin (Merck)	
in Alkohol:	rot, rötlichgelbe Fluoreszenz
in H_2O:	bläulichrot, rötlichgelbe Fluoreszenz
+ NaOH:	schwache Aufhellung, kein Niederschlag; nach Ausschüttelung mit neutralen lipophilen Lösungsmitteln bleiben diese farblos, Fluoreszenz schwach bläulich
+ HCl:	heller rot, kein Niederschlag
+ rauch. HCl:	hellrot, Fluoreszenz verringert
+ H_2SO_4:	rotgelbe Lösung
Pyronin extra (Grübler-Chroma)	
in Alkohol:	gelbrot, intensive gelbgrüne Fluoreszenz
in H_2O:	rein rote Lösung, starke gelbe (grünliche) Fluoreszenz
+ NaOH:	Entfärbung und roter Niederschlag
löslich in:	Alkohol, Aceton, Chloroform: rot, gelbe Fluoreszenz; Benzol, Toluol: gelb, Fluoreszenz sehr schwach; Ligroin: gelb, beim Erwärmen keine Änderung
+ HCl:	orange Lösung, roter Niederschlag
+ rauch. HCl:	orangegelb, grünliche Fluoreszenz
+ H_2SO_4:	orangegelb, grünliche Fluoreszenz
Pyronin B echt stand. (Bayer)	
in Alkohol:	dunkelrot, blaustichiger als P. (Grübler), violettrote Fluoreszenz
in H_2O:	bläulichrot, rotgelbe Fluoreszenz
+ NaOH:	dunkelroter Niederschlag, Entfärbung der Lösung
löslich in:	Alkohol, Aceton, Chloroform: violettstichiges Rot (Fluoreszenz: intensiv hellblau); Benzol, Toluol: nur zum Teil löslich mit bläulichroter Farbe (Fluoreszenz: intensiv dunkelblau)
+ HCl:	heller rot, Fluoreszenz dunkler
+ rauch. HCl:	orangegelb, keine Fluoreszenz
+ H_2SO_4:	dunkelgelb, keine Fluoreszenz

der sich mit gelbrotem Farbton in neutralen lipophilen Lösungsmitteln löst (Tabelle 3). Dieses Präparat benutzte Höfler (1949) zur fluoreszenzmikroskopischen Unterscheidung von „leeren" und „vollen" Zellsäften. Er fand abweichende Ergebnisse von dem anfangs Erwähnten, so vor allem eine gelb- bis ockerbraune Vakuolenfluoreszenz. Struggers Annahme einer Ionenintrabilität ins ungeschädigte Plasma lehnt Höfler ab (vgl. auch Höfler 1933). In der ausgeprägten Lipoidlöslichkeit der Farbbase (P. Grübler) dürfte eine Erklärung für die von Höfler beschriebenen Vakuolenfärbungen zu sehen sein. Es soll hier noch hervorgehoben werden, daß der „alte", von Boerner (1930, 1932) benutzte Pyroninfarbstoff von Grübler nicht mit dem in dieser Arbeit angeführten und wohl auch von Höfler verwendeten Präparat von Grübler identisch sein kann, da sich mit diesem nie eine blaue Fluorochromierung von Lipoiden erzielen ließ. Auf weitere vergleichende Vitalfärbungen mit den verschiedenen Handelsprodukten soll hier nicht mehr näher eingegangen werden.

Aus dem Präparat von Schuchardt-Görlitz läßt sich nach alkalischer Pufferung mit Benzol eine gelbe, gelbgrün fluoreszierende Verbindung ausschütteln, die im Chromatogramm einen sehr geringen R_f-Wert aufweist. Auch die Hauptkomponente verhält sich anders als die von Drawert (1956) erwähnten Farbstoffe.

Das Pyronin B echt stand. von Bayer gibt nach Alkalizusatz sofort einen dunkelvioletten Niederschlag, der sich z. T. in hydrophoben Medien mit rotvioletter Farbe löst. Nach Filtration ist die Lösung schwach violett und fluoresziert zunächst noch gelblich, später etwas bläulich.

Nach Drawert (1940) ist das Pyronin (Hollborn & Söhne) im pH-Bereich von 2 bis 11,5 in Toluol unlöslich. Strugger (1941), der auch im ultravioletten Licht untersuchte, entdeckte die starke ultramarinblaue Fluoreszenz in organischen Lösungsmitteln.

Die bisher erwähnten Farbstoffe kamen also auf Grund des abweichenden Verhaltens für meine Untersuchungen zuerst nicht in Frage. Verwendet wurde deswegen das Präparat von Merck. Pyronin stand. (Bayer) ist wohl mit diesem übereinstimmend. Es schien mir aber wesentlich, die Versuche mit einem heute im Handel befindlichen Farbstoff zu wiederholen, da die Fa. Bayer die Produktion dieses Fabrikates eingestellt hat.

Bei dem Artikel Nr. 7517 von Merck soll es sich nach freundlicher Auskunft der Firma ebenfalls um das in den Schultzschen Farbstofftabellen (7. Aufl.) unter der Nr. 853 aufgeführte „Pyronin G", also das Tetramethyldiaminoxanthyliumchlorid, handeln. Als Summenformel wird $C_{17}H_{19}N_2OCl$ angegeben. Die Eigenschaften stimmen aber bei einfachen Reaktionen nicht mit den Literaturangaben für diesen Farbstoff überein, wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist.

Biehringer (1896) hat die Pyronine einer genaueren Analyse unterzogen. Er erwähnt, daß die damaligen kommerziellen Produkte wegen starker Verunreinigungen für exakte Untersuchungen nicht verwendbar seien, und stellte sich die Substanzen selbst her.

Aus Tab. 3 geht hervor, wie vorsichtig man bei der Verwendung und Beurteilung von Farbstoffen für physiologische Versuche sein muß. Die rein visuellen Angaben über die Farbnuancen werden immer abweichend sein, wenn keine genau definierten Konzentrationen vorliegen. Besonders auffallend ist jedoch das unterschiedliche Verhalten nach Zusatz von Kalilauge. Während Biehringer (1896) eine in Benzol, Toluol usw. mit gelber Farbe lösliche Base angibt (vgl. Pyronin-Grübler), kann diese bei dem von mir verwendeten Präparat nicht nachgewiesen werden. Die farblose

Phase fluoresziert jedoch ganz schwach bläulich. Dies stimmt mit den von Drawert (1940) und Strugger (1941) für Pyronin (Hollborn) gemachten Angaben überein. Strugger gibt jedoch an, daß nach dem Überschreiten des Umschlagbereiches ein Teil der schwerer löslichen Farbbase ausflockt, ähnlich wie es beim Neutralrot der Fall ist. (Leider wird die Farbe des Niederschlages nicht angegeben.) Dies trifft hier nicht zu. Ein Ausflocken der Farbbase konnte ich bei dem von mir benutzten Präparat nicht beobachten. Erst nach längerem Stehen zeigt sich eine ganz geringe schleierartige Trübung, die noch näher analysiert werden wird (S. 556).

b) Analyse des Pyronins (Merck)

Wird eine frisch mit tertiärem Phosphat gepufferte Farblösung zu Vitalfärbungen benutzt, so ist im Fluoreszenzmikroskop (UV als Erregerlicht) keine blaue Plasmafluoreszenz zu beobachten. Die Lösung selbst zeigt eine

Tab. 4. *Fluoreszenzfarben wäßriger Pyroninlösungen nach Pufferung in Abhängigkeit von der Zeit*

nach 1 Stunde	reingelbe Fluoreszenz, keine Änderung
nach 2 Stunden	reingelb, aber etwas blasser
nach 3 Stunden	Grundfarbe gelb mit grauen Farbtönen
nach 4 bis 7 Stunden	die gelbe Grundfarbe weicht langsam einem grauveilen Farbton
nach 8 bis 10 Stunden	Fluoreszenz grauveil. Keine weitere Veränderung
	Ein ultramarinblauer Farbton wird nicht beobachtet

geringe Farbaufhellung, es liegt jedoch noch die gelbe Kationenfluoreszenz vor. Nach Strugger findet eine relativ schnelle Umfärbung oberhalb von pH 10,3 statt, innerhalb von 20 Minuten wird eine Konstanz der Fluoreszenzfarbe erreicht. Bei meinem Präparat ist innerhalb einer halben Stunde keine Farbänderung zu bemerken. Auch nach Ausschüttelung mit Toluol zeigt dieses nur ganz geringe hellblaue Fluoreszenz, wie sie auch bei reinem Toluol vorkommen kann, besonders wenn als Blindprobe mit Wasser ausgeschüttelt wird. Der Farbumschlag tritt aber ein, sobald man die Lösung wenige Minuten bis zum Kochen erhitzt. Unter der Analysenlampe erscheint ein graues Veil. Die gleiche Farbe weist eine ältere Probe vom Vortage auf.

Bei dem Merckschen Präparat erfolgt die Bildung der blaufluoreszierenden Form also wesentlich langsamer. Um die hierfür notwendige Zeit festzustellen, versetzte ich Pyroninlösungen in einstündigem Abstand mit der gleichen Puffermenge und verglich die Farben unter der Quarzlampe (Tab. 4).

Eine gekochte und eine abgestandene Lösung verhalten sich gleich. Wird mit Toluol ausgeschüttelt, so zeigt dies die schöne ultramarinblaue Fluoreszenz. Vitalfärbungen ergeben die von Strugger beschriebenen Bilder.

Papierchromatographisch wurden im Pyronin zwei Verbindungen nachgewiesen (Drawert 1956). Es war wichtig, festzustellen, welcher der beiden Bestandteile für die blaue Toluolfluoreszenz verantwortlich ist. Durch

Eluieren der einzelnen Farbflecke im Chromatogramm kann die Haupt- (HK) und die Nebenkomponente (NK) des Pyronins rein erhalten werden. Die letzte läßt sich auch schneller in größeren Mengen gewinnen, wenn der Farbstoff in einer Zellulosesäule mit absolutem Alkohol behandelt wird. Die HK bleibt stärker adsorbiert, während die NK herausgelöst wird. Die Farbunterschiede der beiden Lösungen gibt Tab. 5 an. Die Konzentrationen sind unbekannt.

Tab. 5. *Farbtöne der durch Chromatographie getrennten Komponenten des Pyronins (Merck)*

	Tageslicht	Fluoreszenz
Hauptkomponente	himbeerrot	orange
Nebenkomponente	hell blaurot	rotorange

In der Elektrophoreseapparatur wandert die HK zur Kathode, mit abnehmender Azidität nur wenig schwächer. Wie bei den meisten basischen Farbstoffen sind, z. T. bedingt durch die Adsorption an die negativ geladenen Gruppen der Zellulose, die zurückgelegten Strecken gering. Jedoch ist bei pH 11,3 innerhalb von 18 Stunden noch eine deutliche Verschiebung zur

Tab. 6. *Ausschüttelungsversuche mit Toluol von verschieden vorbehandelten Pyroninlösungen*

Art der Behandlung				Fluoreszenz des Toluols
1. unbehandelt				schwach hellblau
2.	gekocht			schwach hellblau
3. + n/10 KOH				wie 2, etwas verstärkt
4. + n/10 KOH	gekocht			intensiv ultramarinblau
5. + n/10 KOH	gekocht	+ n HCl	gekocht	wie 4, etwas milchiger
6.		+ n HCl		gelblich, Eigenfarbe rötl.
7.		+ n HCl	gekocht	wie 6

Kathode sichtbar. Die Front des Farbfleckes fluoresziert gelb, woran sich eine lila Übergangszone anschließt. Der Startfleck leuchtet blau auf. Auch hierin macht sich die langsame Umlagerung zur Base bemerkbar.

Die Nebenkomponente zeigt ein annähernd gleiches Verhalten. Bei Ausschüttelung mit Benzol geht die NK im neutralen und alkalischen Bereich unter Farbverlust in die organische Phase über.

Eine Fluoreszenz ist nicht sichtbar. Wird dagegen mit HCl stärker angesäuert, ist die NK —vielleicht mit geringen Wasserspuren — im Benzol löslich. Beide Phasen fluoreszieren gelblich.

Die Hauptkomponente zeigt nach Pufferzusatz und Aufkochen den beschriebenen Farbumschlag, sie ist somit für die ultramarinblaue Lipoidfluoreszenz verantwortlich.

Auffällig ist, daß sich die Blaufluoreszenz des Benzols oder Toluols durch Ausschüttelung mit verdünnter Salzsäure nicht wieder entfernen läßt, wie

wir es von den üblichen Farbbasen her kennen. Die wäßrige Lösung bleibt völlig farblos. Es wird vermutet, daß der blauen Pyroninfluoreszenz nicht eine normale Basenbildung zugrunde liegt, sondern bei der Alkalisierung eine irreversible chemische Umlagerung erfolgt.

Weitere Versuche stützen diese Ansicht. Gleiche Mengen Farblösung werden wie folgt behandelt und nach dem Ausschütteln mit Toluol die Fluoreszenzintensitäten verglichen. Die Volumen werden durch Zugabe von Wasser konstant gehalten (Tab. 6).

Ein Aufkochen der reinen Farblösung bewirkt keinerlei Veränderungen. Wie ich schon bei der Ausschüttelung der Nebenkomponente im stark sauren Milieu beschrieben habe, ist diese in Spuren mit gelblicher Fluoreszenz in Benzol löslich. Dieser Fall liegt bei 5, 6 und 7 vor.

Auch die milchige Farbe bei Versuch 4 kann darauf beruhen. Wird das Toluol wiederholt mit schwach angesäuertem Wasser ausgeschüttelt, so verschwindet die weißlich-gelbe Überlagerung, und die ultramarinblaue Fluoreszenz unterscheidet sich nicht von Punkt 4.

Bei der Behandlung einer Pyroninlösung mit Alkalien finden irgendwelche Veränderungen des Farbstoffmoleküls statt, die sich auch nach starker Ansäuerung als nicht reversibel erweisen.

Hiermit stehen gewisse Beobachtungen Struggers (1941, S. 124 f.) in Zusammenhang, die ich als solche bestätigen kann, ohne mich den Schlußfolgerungen anzuschließen. Der Autor geht der Frage nach, ob sich innerhalb kurzer Färbezeiten ein Einfluß des Außenpuffers auf die Aziditätslage der Plasmaeiweiße bemerkbar macht. Er färbt Zwiebel-Oberepidermen in schwach sauren Lösungen und überträgt diese dann in einen farblosen Puffer von pH 11,25. Innerhalb von 20 Minuten bleibt die gelbe Kationenfluoreszenz völlig erhalten. Das Plasma nimmt erst nach einer Stunde eine blaugraue Färbung an, in Verbindung mit nekrotischen Veränderungen, die durch den hohen pH-Wert bedingt sind. Bei dem von mir untersuchten Farbstoff brauchen diese Erscheinungen nicht mit einem Nichteindringen des Puffers in die Plasmaphasen in Zusammenhang zu stehen, da der Farbumschlag in vitro auch erst nach mehreren Stunden erfolgt. Ferner berichtet Strugger von Versuchen in umgekehrter Reihenfolge. Zellen mit blau fluoreszierenden Protoplasten werden in saure Puffer überführt, ohne daß eine Kationenfluoreszenz bemerkbar wird. Meine Versuche können hierfür eine Erklärung bieten. Auch in Modellversuchen erfolgt keine sekundäre Farbstoffverschiebung. Somit können auf Grund der Pyronin-Vitalfärbungen keine Aussagen über das Eindringen oder Nichteindringen von Pufferlösungen in die Eiweißkomponenten des Plasmas gemacht werden.

B. Untersuchungen über die UV-Strahleneinwirkung bei Pyroninfärbungen

Die Beobachtungen Struggers (1941) über die Umwandlung der blaufluoreszierenden Pyroninphase zum Kation im UV-Licht sind schon anfangs erwähnt worden. Die Versuche am Gelatine-Benzol-Modell wurden mit gepufferten und gekochten Pyroninlösungen wiederholt und können bestätigt werden. Nach einigen Sekunden verlöscht die ultramarinblaue Fluoreszenz der Benzoltröpfchen, und in der Gelatine breitet sich ein deutlich fluoreszierender Hof aus. Strugger gibt die Farbe mit einem hellen

Grüngelb an. Ähnliche Farbtöne beschreibt er auch an fixierten Zellen. Bei meinen Versuchen tritt eine hellblaue Fluoreszenz auf. Störend wirkt sich hier die gelbe Eigenfluoreszenz der Gelatine aus, außerdem liegt noch eine schwache Kationenfärbung vor, die eine genaue Farbbestimmung unmöglich macht. Die Durchmischung von Gelatine mit bereits blau fluoreszierendem Benzol oder Paraffinum liqu., welches nicht so leicht flüchtig ist, bringt keine eindeutigen Ergebnisse. Die Versuchsanordnung wird deswegen dahingehend modifiziert, daß auf einen hohlgeschliffenen Objektträger ein vorbehandelter Benzoltropfen mit Wasser zusammengebracht wird. Nach Auflegen eines Deckgläschens ist der fluoreszierende Benzoltropfen von farblosem Wasser umgeben. Bringt man das Präparat unter das Mikroskop, so zeigt sich an der von den Strahlen getroffenen Stelle gleichzeitig mit dem Fluoreszenzverlust der organischen Phase die Ausbreitung eines hellblau aufleuchtenden Stoffes im Wasser. Dieser Vorgang ist irreversibel. Der „Erholungsgang" am Gelatine-Modell muß demnach so verstanden werden, daß in der Gelatine noch vorhandene unveränderte Basenmoleküle nach einiger Zeit in das lipophile Medium eindiffundieren und sich dort anreichern. Nach Strugger ist die Erholungszeit von der Dauer der Einstrahlung abhängig. Nun wird aber nicht nur der Benzoltropfen vom UV-Licht getroffen, sondern das gesamte Blickfeld, so daß auch in der Gelatine vorliegende Basenmoleküle zerstört werden. Ein längerer Diffusionsweg ist die Folge.

Die Einwirkung kurzwelliger Strahlen auf den blau fluoreszierenden Pyroninkörper führt nicht zu einer Umwandlung zum Farbsalz oder Kation, sondern zu einer irreversiblen chemischen Veränderung.

Wenn man voraussetzt, daß das Präparat von Hollborn die gleiche Verunreinigung wie der Mercksche Farbstoff enthält, kann eine Erklärung für die bei Strugger erwähnten gelben und gelbgrünen Farbtöne gegeben werden. Vitalfärbungen mit der isolierten Nebenkomponente führen zu gelblich-braunen Plasma- und Kernfluoreszenzen. Diese werden bei Färbung mit dem ungereinigten Pyronin zunächst durch die intensive Blaufluoreszenz überdeckt; erst wenn diese durch die Strahlenwirkung abgeschwächt ist, erscheinen grünliche oder gelbe Farbtöne.

Wie beim Neutralrot nahm ich auch hier Bestrahlungen im größeren Umfang vor. Eine gekochte alkalische Farblösung wurde mit Toluol ausgeschüttelt, dieses dann abgetrennt und in der Hitze eingeengt. Dabei verschwand die ultramarinblaue Fluoreszenz, die beim Abkühlen jedoch wieder in der alten Stärke erschien. Wie wir gesehen haben, ist nach dieser Behandlung auch die Nebenkomponente im Toluol enthalten. Diese läßt sich mit schwach angesäuertem Wasser nur zum Teil ausschütteln. Wie papierchromatographisch festgestellt wurde, kann sie aber quantitativ entfernt werden, wenn man das Toluol mit wasserfreiem Kupfersulfat behandelt. Dabei findet wahrscheinlich eine Adsorption zusammen mit geringen Wasserspuren statt. Das Kupfersulfat färbt sich violett. Nach Filtration ist die Lösung völlig farblos.

Das so gereinigte Toluol wurde dem Quecksilberdampflicht ausgesetzt. Schon nach 3 bis 5 Minuten schlug die ultramarinblaue Fluoreszenz in eine weißlich-hellblaue um, während sich eine gelbliche bis hellbraune Eigenfarbe

zeigte. Durch Ausschütteln mit dest. Wasser konnte die gelbe, hellblau fluoreszierende Bestrahlungskomponente rein erhalten werden. Das chromatographische Bild ist in Abb. 9 wiedergegeben.

Das Photoderivat weist rein hydrophile Eigenschaften auf. Durch Änderung des pH-Wertes der Lösung gelang es nicht, die Verbindung wieder in ein hydrophobes organisches Lösungsmittel zu überführen. In der Elektrophoreseapparatur wurde nach 20 Stunden keinerlei Wanderung festgestellt, was auf das Fehlen einer Ladung deutet.

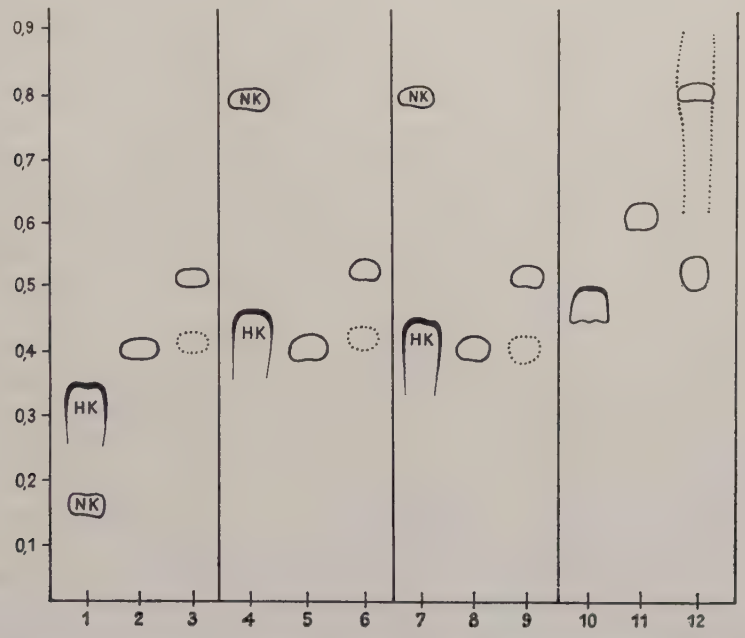

Abb. 9. Papierchromatographische Analyse der Pyroninfarbstoffe (*HK* = Hauptkomponente, *NK* = Nebenkomponente). *1* = Pyronin (Schuchardt), *2* = Xanthon, *3* = Bestrahlungkomponente, *4* = Akridinrot (Grübler), *5* = Xanthon, *6* = Bestrahlungskomponente, *7* = Pyronin (Merck), *8* = Xanthon, *9* = Bestrahlungskomponente, *10* = Pyronin B (echt stand. Bayer), *11* = Xanthon, *12* = Bestrahlungskomponente.

Im Gegensatz zu der Strahleneinwirkung beim Neutralrot findet die Umwandlung zur hydrophilen Form bei Pyronin auch unter Sauerstoffabschluß statt. Eine nähere Angabe über die Art der Reaktion kann hier nicht gegeben werden. Sie muß chemischen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Eine gewisse Übereinstimmung findet sich noch mit dem unbehandelten lipophilen Stoff. Wenn man das blau fluoreszierende Toluol mit wenig Eisessig versetzt, so schlägt die Fluoreszenz in ein helles Grün um. Wird die hydrophile Komponente angesäuert, verändert sich die Farbe ebenso von Hellblau nach Grün. Beide Vorgänge sind reversibel, sobald die Säure wieder entfernt wird.

Bei Vitalfärbungen an Zwiebelzellen mit dem wasserlöslichen Stoff leuchten im Fluoreszenzmikroskop (UV als Erregerlicht) Zellkerne und Plasma diffus hellblau, im Blaulicht werden gelbliche Farbtöne beobachtet.

C. Untersuchungen über die ultramarinblaue fluoreszierende „Farbbase"

Auf das merkwürdige, im Gegensatz zu vielen anderen basischen Farbbasen stehende Verhalten der von Strugger (1941, 1947, 1949) und Perner (1952) als lipophil und ultramarinblau fluoreszierend beschriebenen Pyroninbase habe ich schon hingewiesen. Es wurde vermutet, daß es sich bei dem nur langsam verlaufenden Prozeß der Umfärbung, welcher durch Aufkochen beschleunigt werden kann, um eine irreversible Veränderung handeln könnte. Aufschlußreich sind die Untersuchungen von Biehringer (1896), der auf die hohe Empfindlichkeit des Pyronins hinweist: „Bei der Behandlung des Tetramethyldiamidophenylmethans mit conc. Schwefelsäure, bei der Oxydation der Anhydrobase durch unorganische Mittel, beim Kochen der Farbstoffbase mit Salzsäure, selbst beim Ausfällen derselben aus saurer Lösung durch Alkali, entsteht in sehr geringer Menge ein Nebenprodukt, welches den Lösungen der genannten in Säuren nach starker Verdünnung durch Ausschüttelung mit Äther oder Chloroform entzogen werden kann. Setzt man zu der farblosen ätherischen Lösung etwas Alkohol, so zeigt dieselbe eine prächtig blaue Fluoreszenz, welche auf Zusatz von Eisessig in eine fast ebenso intensive grüne Fluoreszenz umschlägt."

Dieses Nebenprodukt entsteht beim Behandeln mit Alkalien nur in sehr geringer Menge. Durch Zusatz von Oxydationsmitteln wie z. B. rotem Blutlaugensalz gelingt es Biehringer, die Ausbeute des fluoreszierenden Körpers auf 10% zu steigern. Er identifiziert ihn als Tetramethyldiamidoxanthon. Die Reaktion ist nur in alkalischer Lösung möglich, da hier die freie Carbinolgruppe vorhanden ist, während in saurem Milieu durch die Salzbildung eine Oxydation verhindert wird.

Die Versuche wurden teilweise mit dem Präparat von Merck wiederholt. Nach Zugabe von rotem Blutlaugensalz wurde eine verstärkte Xanthonbildung beobachtet.

Noch bessere Ergebnisse konnte ich aber erzielen, wenn ich zu der alkalisierten Lösung einige Tropfen konz. H_2O_2 hinzugab und aufkochte. Die Farbe hellte sich stark auf. Der noch zu bemerkende gelbrosa Farbton war durch die Anwesenheit der Nebenkomponente bedingt. Verwendete ich den gereinigten Farbstoff, so entfärbte sich die Lösung vollständig. Beim Abkühlen fiel das Xanthon in feinen weißen Flöckchen aus und konnte rein erhalten werden. Auf diese Weise standen für die Bestrahlung konzentrierte Lösungen zur Verfügung.

Wie eine chromatographische Analyse ergibt (Abb. 9), läßt sich auch bei anderen Fabrikaten die Oxydation zum Xanthon durchführen. Das Pyronin von Schuchardt zeigt einen sehr geringen *R_f-Wert*. Der ultramarin-

blau fluoreszierende Fleck des Oxydationsproduktes liegt aber ungefähr auf gleicher Höhe wie das Xanthon des Merckschen Präparates. Die Depression könnte durch die Anwesenheit eines anderen anorganischen Fremdsalzes bedingt sein. Abgesehen von der stark lipoidlöslichen gelben Nebenkomponente ist das Verhalten dieses Farbstoffes dem oben geschilderten ähnlich. Nach alkalischer Pufferung bildet sich kein Niederschlag.

Auf die Übereinstimmung zwischen Akridinrot (Grübler) und Pyronin (Merck) ist schon hingewiesen worden. Auch die Xanthone und die hydrophilen Bestrahlungsprodukte zeigen im Chromatogramm ein gleiches Verhalten. Bei der Ausschüttelung des bestrahlten Toluols oder Benzols mit destilliertem Wasser gehen auch geringe Mengen des unveränderten Xanthons mit in dieses über. Besonders bei erhöhter Temperatur ist das Oxydationsprodukt z. T. in Wasser löslich.

Beim Tetraaethyldiaminoxanthyliumchlorid (Pyronin B echt stand. Bayer) erfolgt die Bildung des Xanthons wesentlich schneller und leichter. Nach Pufferung fällt diese Base als dunkelvioletter Niederschlag sofort aus (Tab. 3), die wäßrige Lösung fluoresziert augenblicklich blau. Mit Benzol und Toluol läßt sich das Oxydationsprodukt zusammen mit einem Teil der Base ausschütteln. Die Konzentration in der organischen Phase ist so stark, daß die Fluoreszenz dadurch abgeschwächt wird und erst nach Verdünnung mit reinem Benzol zur Geltung kommt. Auch hier läßt sich der Farbstoff durch H_2O_2 quantitativ zum ungefärbten Xanthon umwandeln. Der R_f-Wert ist wesentlich höher (Abb. 9). Die Strahlenempfindlichkeit des Tetraaethyldiaminoxanthons ist erheblich geringer. Bei der Betrachtung eines Benzoltropfens unter dem Mikroskop dauert es einige Minuten, bis sich die Ausbreitung eines hellblau fluoreszierenden Stoffes im umgebenden Wasser bemerkbar macht. Zu einer völligen Fluoreszenzlöschung des Benzols kommt es hier nicht. Das durch Ausschüttelung mit Wasser gewonnene Bestrahlungsprodukt enthält keine Spuren des unveränderten Xanthons, die sich chromatographisch nachweisen lassen. Auffällig ist ein ultramarinblau fluoreszierender Farbfleck in der Höhe der Bestrahlungskomponenten der anderen untersuchten Präparate. Weiter oben leuchtet eine lang ausgezogene Fahne unter der Quarzlampe hellblau auf.

Durch die substituierten Äthylgruppen besitzt das Xanthon des Pyronin B eine stärkere Lipophilie, die sich in dem höheren R_f-Wert ausdrückt, ebenso in der geringen Löslichkeit in Wasser. Damit stimmen die Befunde bei Vitalfärbungsversuchen überein. Obwohl durch alkalische Pufferung eine starke Xanthonbildung eintritt, kann nur eine sehr schwache Plasmafluoreszenz beobachtet werden. Auch bei Annahme eines reinen Lösungsvorganges in den lipoiden Phasen des Plasmas scheint eine gewisse Hydrophilie des Stoffes notwendig zu sein, damit es zu einer Aufnahme in die lebende Zelle kommt. Die Fluoreszenz ist hier gegen UV-Strahlen wesentlich beständiger.

Zu den Angaben von Strugger (1941, 1947, 1949), Boerner (1950, 1952) und Perner (1952) muß also nach meinen Befunden gesagt werden, daß das Pyronin (Merck) keinen zweifarbigen Fluoreszenzindikator darstellt. Die blaue Fluoreszenz, die bei der Behandlung des Farbstoffs mit basischen Pufferlösungen beobachtet wird, ist nicht auf die Pyroninbase zurückzuführen. Unter diesen Bedingungen findet in geringen Mengen eine Oxydation der Carbinolbase zum Xanthon statt.

III. Das Verhalten von Janusgrün B im kurzwelligen Licht

Meine Untersuchungen haben gezeigt, welche Veränderungen während der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung an den Farbstoffen auftreten können, besonders bei Verwendung der starken Quecksilberdampflampen als Strahlenquelle. Es wird in Zukunft nötig sein, noch weitere Farbstoffe auf ihre Strahlenfestigkeit zu prüfen, ehe man aus den mikroskopischen Befunden Rückschlüsse auf die in den jeweiligen Speicherorten vorliegenden Verhältnisse ziehen kann. So berichten Drawert (1953) vom Berberinsulfat und Kuttig (1957) von verschiedenen Triphenylmethanfarbstoffen, daß sich erst unter der Mithilfe der Strahlenwirkung eine Fluorochromierung der Sphärosomen erzielen läßt, wobei auch Reduktionsprozesse eine Rolle spielen. Das Verhalten von Janusgrün B bei der Vitalfärbung von Zwiebelepidermen ist von Drawert (1953) eingehend studiert worden, so daß hier keine näheren Angaben gemacht zu werden brauchen. Dort finden sich auch weitere Literaturangaben über die Verwendung dieses vor allem zum Nachweis der Chondriosomen häufig benutzten Farbstoffes, ebenso Angaben über die Löslichkeitsverhältnisse der verschiedenen Reduktionsformen und das etwas unterschiedliche Verhalten einzelner Farbstoffabrikate.

Für meine Untersuchungen benutzte ich hauptsächlich das Janusgrün B (IG), als Objekt dienten wieder die *Allium*-OE-Zellen. Beobachtet man ein mit Janusgrün 1 : 10 000 in Leitungswasser angefärbtes Epidermishäutchen wenige Minuten nach Deckglasabschluß (Umrandung mit Vaseline) im Fluoreszenzmikroskop mit dem Licht eines Kohlebogens, so ergeben sich die von Drawert (1953) beschriebenen Bilder: während der Wundrand meist eine mehr oder weniger starke Schädigung zu erkennen gibt, lassen sich, in den zentralen Zellen beginnend, die Sphärosomen durch ihre elektive grünlich-gelbe Fluoreszenz nachweisen. Die Intensität ist von der Dauer des Deckglasabschlusses abhängig.

Wird dagegen die intensive Strahlung einer Quecksilberhöchstdrucklampe zur Fluoreszenzanregung benutzt, so ergibt sich bei der mikroskopischen Betrachtung ein verändertes, nicht exakt beschreibbares Bild. Besonders in dem zentralen Bereich des Epidermishäutchens läßt das Plasma eine zuerst dunkelorange, sich schnell zu einem reinen Gelb verstärkende Fluoreszenz erkennen. Der Vorgang verläuft mit solcher Geschwindigkeit, daß nicht sicher zu entscheiden ist, ob eine schwache Fluoreszenz bereits primär vorliegt oder ob sie erst durch die Einwirkung der kurzwelligen Strahlen hervorgerufen wird. Man vergleiche hierzu auch die Untersuchungen von Kärber (1958, S. 81). Während anfänglich die Sphärosomen noch gelblich durch die orangerote Fluoreszenz der Plasmagrundsubstanz hindurchleuchten, wird nach wenigen Sekunden alles gelb überstrahlt. Wie das Plasma verhält sich auch der zuerst schwach purpurrot erscheinende Kern. Durch Zuführung von H_2O_2-haltigem Wasser erfolgt keine Veränderung des Farbbildes.

Im Zusammenhang mit der von Drawert (1953) beobachteten Fluorochromierung der Sphärosomen mit der reduzierten, farblosen Form des

Janusgrüns und der Möglichkeit, durch eine UV-Bestrahlung die Reduktion eines Farbstoffes herbeizuführen oder zu beschleunigen, war es von Interesse zu prüfen, ob sich die Fluoreszenzveränderung vitalgefärbter Zellen, ebenso wie bei Neutralrot oder Pyronin auf eine Umwandlung des Farbstoffes zurückführen läßt.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung abgestorbener oder fixierter Zellen sind die beschriebenen Phänomene nicht zu beobachten, die Lebenstätigkeit des Gewebes ist von entscheidender Bedeutung hierfür.

Janusgrün ist ein Azofarbstoff, der durch Diazotierung von Diaethylsafranin und Kuppelung mit Dimethylanilin gebildet wird. Bei der Reduktion müssen zwei verschiedene Stufen unterschieden werden: eine rot gefärbte Form, die durch eine irreversible Abspaltung von p-Dimethylaminanilin entsteht und ein unsymmetrisches Diaethylsafranin darstellt, und die farblose Leukoverbindung dieses Safranins. Diese beiden Reduktionsschritte werden auch von der lebenden Zelle ausgelöst, sobald durch Deckglasabschluß der Sauerstoffgehalt verringert wird.

Zur Klärung der oben beschriebenen Erscheinungen mußten wieder Modellversuche durchgeführt werden, und zwar waren alle drei möglichen Formen, das Janusgrün, das Diaethylsafranin und dessen Leukoverbindung, auf ihr Verhalten im kurzwelligen Licht zu prüfen.

1. Janusgrün B (IG, Bayer, Grübler-Berlin-West), Diazingrün (Merck), Janus Green B (N. A. D.), 1 : 10.000 in destilliertem Wasser gelöst, wurden 30 Minuten lang mit der Quecksilberhöchstdrucklampe bestrahlt. Es war keinerlei Veränderung zu beobachten. Auch im Chromatogramm verhielten sich bestrahlte und unbestrahlte, nur erwärmte Lösungen gleich.

2. Diaethylsafranin: Die gleiche Lösung wie unter 1 wurde mit $Na_2S_2O_4$ reduziert. Nach einer anfänglichen völligen Entfärbung kehrt beim Schütteln an der Luft rasch die rote Farbe der 1. Reduktionsstufe wieder. Durch Erwärmen konnte dieser Vorgang beschleunigt und wohl auch vervollständigt werden. Nach der gleichen Bestrahlung wie oben war keinerlei Beeinflussung des Farbstoffes zu bemerken.

3. Leukosafranin: Durch einen Überschuß des zugesetzten Reduktionsmittels ließ sich die Janusgrünlösung bis zur farblosen Stufe reduzieren, ohne daß sofort wieder eine Reoxydation erfolgte. Um diese während der Bestrahlung zu verhindern, wurde unter Stickstoff gearbeitet. Reduktionen mit Dithionit oder Wasserstoff bei Anwesenheit von Palladium verhielten sich gleich. Die 2. Reduktionsstufe ist völlig farblos, unter der Analysenlampe zeigt sie eine etwas schmutzig-grünliche Fluoreszenz. Bei der Verwendung von Dithionit bildet sich ein flockiger Niederschlag. Wird die Lösung nun in den Strahlengang gebracht, so erscheint fast augenblicklich eine intensive reingelbe Fluoreszenz an den Stellen, die von den Strahlen getroffen werden. Während beim Neutralrot der Brenner HBO 74 nur schwache Wirkung hervorrief, ist die Fluoreszenzveränderung und -verstärkung hier bereits unter der Analysenlampe während kurzer Beobachtungszeiten sichtbar.

Die Modellversuche geben eine Erklärung für die mikroskopischen Befunde. Das Janusgrün und das Diaethylsafranin werden von den Strahlen nicht verändert, wohl aber die Leukoverbindung. In toten Zellen kann

die Reaktion nicht ausgelöst werden, erst wenn es durch die Lebenstätigkeit der Zelle bei Sauerstoffmangel zu einer völligen Reduktion des Farbstoffes gekommen ist, erscheint unter der Strahleneinwirkung die intensive gelbe Fluoreszenz.

Wird die bestrahlte Lösung an Luft gut durchgeschüttelt, so findet je nach dem Anteil des veränderten Farbstoffes wieder eine Umfärbung nach Gelblich-Rosa oder Rot statt. Durch Ausschütteln mit Chloroform kann ein Teil des Safranins entfernt werden (D r a w e r t 1953); dies gelingt noch besser, wenn die völlig reduzierte Form ausgeschüttelt wird, da diese sich durch stärkere Lipophilie auszeichnet. So ließ sich eine fast reingelbe Lösung gewinnen. Das chromatographische Verhalten der Bestrahlungskomponente ist aus Abb. 10 ersichtlich.

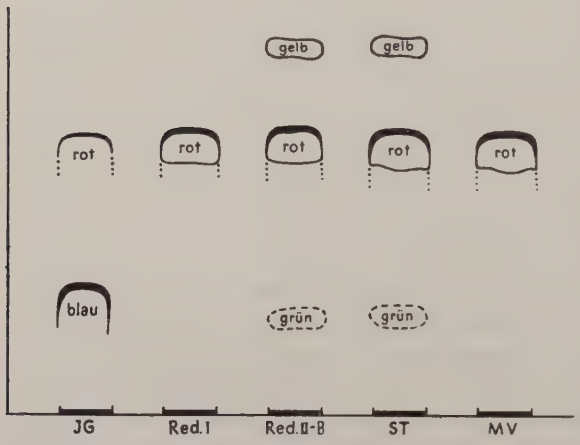

Abb. 10. Papierchromatographische Analyse von Janusgrün B, *JG* = Janusgrün B unbehandelt, *Red. I* = 1. Reduktionsstufe (Diaethylsafranin), *Red. II-B* = Reduktionsstufe bestrahlt, *ST* = Safranin T, reduziert und bestrahlt, *MV* = Methylenviolett (Hollborn u. S.).

Janusgrün B (IG) enthält stets auch einen geringen Anteil des Safranins. Die bei Bestrahlung der Leukoverbindung entstehende gelb fluoreszierende Komponente zeichnet sich durch einen höheren R_f-Wert aus. Daneben wird bei der belichteten Lösung gelegentlich noch ein schwach grünlich aufleuchtender Fleck wahrgenommen. Dieser wird auch bei einer im reduzierten Zustand bestrahlten Safranin T-(Merck)-Lösung beobachtet, bei der sich in gleicher Weise das stark fluoreszierende Produkt bildet. Zum Vergleich wurden noch andere Safraninfarbstoffe mit herangezogen, so das Safranin O (Chroma), Methylenviolett (Hollborn & Söhne — nach den Farbstofftabellen von Schultz Nr. 959 handelt es sich um das Dimethyl-diaminophenosafranin), Methylenviolett stand. (Bayer — der Farbstoff wird von der Firma als Diaethyl-phenosafranin bezeichnet), und das Phenosafranin stand. (Bayer). Auch bei diesen, soweit es sich chromatographisch feststellen läßt, wohl teilweise einander identischen Farbstoffen kann die Entstehung eines intensiv fluoreszierenden Stoffes durch die Strahlenwirkung festgestellt werden.

In der Elektrophoreseapparatur wandert die gelbe Komponente stärker als das Janusgrün oder die 1. Reduktionsstufe zur Kathode, im Bereich von pH 3,5—10,3 annähernd im gleichen Maße.

Während beim Neutralrot eine photooxydative Zerstörung nachgewiesen werden konnte, handelt es sich hier möglicherweise um eine intramolekulare

Veränderung, da der Farbstoff außerordentlich labil ist. Es gelang nicht, ihn rein darzustellen. Bei Erwärmung schlägt die Farbe wieder nach Rot um, und im Chromatogramm ist dann kein Unterschied zur 1. Reduktionsstufe (= Diaethylsafranin) zu beobachten. Dasselbe geschieht beim Einengen im Vakuum. Die Zeit bis zum Farbumschlag ist stark vom pH-Wert der Lösung abhängig, am längsten ist die gelbe Verbindung zwischen pH 4,5 und 6 haltbar. Zugabe von H_2O_2 bewirkt auch hier, wie bei vitalgefärbten Zellen, keine Beschleunigung des Vorganges.

Vitalfärbeversuche lieferten keine eindeutigen Ergebnisse, da der Farbstoff nicht rein vorlag. Eine intensive gelbe Fluorochromierung der Membranen war zu beobachten, das Plasma verhielt sich unterschiedlich in der Anfärbung, gelegentlich trat eine starke Aufquellung ein, wobei sofort intensiv gelb fluoreszierende Granula zu sehen waren, deren Fluoreszenz aber fast augenblicklich wieder gelöscht wurde. Die Kerne, ebenfalls meist stark aufgequollen, leuchteten gelb auf, die Nukleolen schienen farblos zu sein. Auch hier wurde die Fluoreszenz innerhalb von 20 bis 60 Sekunden wieder gelöscht.

Zusammenfassung

Die basischen Vitalfarbstoffe Neutralrot, „Fluoreszent X“ (reduziertes Neutralrot) sowie Pyronin und Janusgrün B werden auf ihr Verhalten im kurzwelligen Licht untersucht.

Ergänzend zu den Befunden von Drawert und Metzner (1956), nach denen unter der Einwirkung des Erregerlichtes eines Fluoreszenzmikroskopes aus dem kationischen Neutralrot ein grün fluoreszierender, negativ geladener Körper entsteht, wird festgestellt, daß es sich hierbei um eine photooxydative Zerstörung des Farbstoffes handelt. Dieser Vorgang ist an die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff gebunden.

Nur die Farbbase ist strahlenempfindlich. Wird diese in Toluol oder anderen lipophilen neutralen Reagenzien gelöst und dem Licht einer Quecksilberhöchstdrucklampe ausgesetzt, so entstehen mindestens sieben verschiedene grünlich bis gelblich fluoreszierende Verbindungen. Mit Hilfe der Papierelektrophorese läßt sich eine gute Trennung erzielen. Auf Grund von Lösungsunterschieden können aus dem Reaktionsgemisch eine gelb fluoreszierende, in saurer Lösung lipoidlösliche Komponente und eine extrem hydrophobe Verbindung von den wasserlöslichen Anteilen isoliert werden.

Bestrahlt man den Farbstoff in gepufferten wäßrigen Medien, entstehen bei der Elektrophorese sich abweichend verhaltende Zersetzungsprodukte. Auf die mögliche Bedeutung dieser Erscheinung für die Analyse der Vitalfluorochromierung wird hingewiesen.

Bei einer weiteren Einwirkung des energiereichen Lichtes zersetzen sich die grün fluoreszierenden Zwischenprodukte weiter zu farb- und fluoreszenzlosen Verbindungen.

Infolge der intensiven Fluoreszenz der anionischen Komponenten können in der pflanzlichen Zelle noch geringste Spuren von Neutralrot nachge-

wiesen werden, auch wenn im Hellfeld keine Rotfärbung zu erkennen ist.

Die Auslösung einer sekundären Fluoreszenz in den „leeren" Vakuolen der oberen Zwiebelepidermis bei pH 3 läßt auf eine Permeation der Farbbase schließen, ohne daß es hier jedoch zu einer stärkeren Speicherung kommt.

Die Verteilung der Farbstoffe Neutralrot, Akridinorange und Thionin zwischen einer wäßrigen Phase und Benzol in Abhängigkeit von der Azidität wird photometrisch quantitativ gemessen. Die Verteilungsgleichgewichte der drei Farbstoffe stehen nicht in direktem Zusammenhang mit dem Verlauf ihrer Dissoziationskurven. Es läßt sich zeigen, daß die Größe der maximalen Lipoidlöslichkeit hierbei von entscheidendem Einfluß ist. Diese wird für Neutralrot, Akridinorange und Thionin bestimmt.

Nach den Befunden kann die Aufnahme der Farbstoffe auf Grund ihrer Lipoidlöslichkeit erklärt werden, ohne daß nichtosmotische oder metaosmotische Aufnahmeprozesse angenommen werden müssen. Über die Speicherungsprozesse werden dabei keine Aussagen gemacht.

Die reduzierte Form des Neutralrots zeigt bei Gegenwart von Sauerstoff ebenfalls eine Reaktion im kurzwelligen Licht. Die intensive Fluoreszenz wird dabei vernichtet, eine Reoxydation zum Neutralrot findet aber wahrscheinlich nicht statt. Die Aufnahme des Farbstoffes wird durch die Lipophilie der Leukobase ermöglicht, die sich unter völligem Farbverlust in neutralen hydrophoben Medien löst.

Die verschiedenen Pyroninpräparate des Handels weichen in ihren chemischen Eigenschaften und Reinheitsgraden stark voneinander ab. Dadurch lassen sich manche Widersprüche in der Literatur erklären.

Die ultramarinblaue Fluoreszenz basischer Pyroninlösungen ist nicht auf die Pyroninbase zurückzuführen. Bei der Behandlung des Farbstoffes mit Alkalien erfolgt in geringer Menge die Oxydation des Xanthenderivates zum lipophilen Xanthon. Diesem kommt die intensive Fluoreszenz zu. Durch Säurezugabe ist dieser Prozeß nicht umkehrbar. Besonders das Xanthon des Tetramethyldiaminoxanthyliumchlorids (Pyronin G) erweist sich in höchstem Maße als strahlenempfindlich.

Der Azofarbstoff Janusgrün B und seine rote Reduktionsstufe (Diaethylsafranin) sind im kurzwelligen Licht weitgehend beständig. Die zweite, farblose Reduktionsform (Leukosafranin) zeigt eine äußerst schnelle Strahlenreaktion. Dabei entsteht eine labile gelb fluoreszierende Verbindung, die durch H_2O_2 nicht verändert wird, sich aber nach einiger Zeit wieder in das rote Safranin zurückverwandelt.

Auf verschiedene in der Literatur beschriebene Reaktionen organischer Stoffe im kurzwelligen Licht wird hingewiesen und auf die Notwendigkeit einer genauen Farbstoffanalyse, ehe sich Schlußfolgerungen aus dem Fluoreszenzbild vitalgefärbter Objekte ziehen lassen.

Die Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Professor Dr. H. Drawert durchgeführt, dem ich auch an dieser Stelle für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für die fördernde Anteilnahme am Fortgang der Untersuchungen Dank sage.

Literatur

Bachér, F., 1929: Chemische Reaktionen organischer Körper im ultravioletten Licht und im Licht der Sonne. In: Abderhalden, Handb. biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, T. 2 II 1, 3, 1339.

Bartels, P., 1954: Quantitative mikrospektrographische Untersuchung der Speicherungs- und Permeabilitätsverhältnisse akridinorangegefärbter Zellen. Planta *44*, 341.

— 1956 a: Spektralphotometrische Untersuchungen am Neutralrot (I). Prototropie-Gleichgewichte und Normaltemperaturspektren im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich. Z. phys. Chem. *9*, 74.

— 1956 b: Spektralphotometrische Untersuchungen am Neutralrot (II). Das Assoziationsverhalten in wäßriger Lösung. Z. phys. Chem. *9*, 95.

— und H. O. Schwantes, 1955: Quantitative mikrospektrographische Messungen zur Aufnahme von Thionin durch lebende Zellen von *Allium cepa*. Z. Naturforsch. *10 b*, 712.

— — 1957: Mikrospektrographische Messungen zur Aufnahme und Speicherung von Neutralrot durch lebende Zellen von *Allium cepa*. Planta *50*, 1.

Bazin, S., 1946: Influence de la constitution chimique de divers colorants sur leur pénétration dans la cellule vivante de *Chara*. C. r. soc. biol. *140*, 210.

Biebl, R., 1942 a: Wirkung der UV-Strahlung auf *Allium*-Zellen. Protoplasma *36*, 491.

— 1942 b: Wirkung der UV-Strahlung auf die Plasmapermeabilität. Protoplasma *37*, 1.

— 1947: Strahlenwirkungen auf das pflanzliche Protoplasma. Mikroskopie *2*, 328.

— und W. Url, 1958: UV-Strahlenwirkung auf Zellen von *Allium cepa*, besonders deren Chondriosomen und Plastiden. Protoplasma *49*, 329.

Biehringer, J., 1896: Über die Farbstoffe der Pyroningruppe. J. prakt. Chem. *54*, 217.

Bierry, H., V. Henri und A. Ranc, 1910: Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Kohlehydrate. Chem. Zbl. *81*, II, 1038 (C. r. d. Acad. Sci. *151*, 316).

— — — 1911: Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Glycerin. Chem. Zbl. *82*, I, 1196 (C. r. Acad. Sci. *152*, 535).

Boerner, D., 1950: Fluoreszenzmikroskopische Studien an der Haut. Mikroskopie *5*, 235.

— 1952: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Lipoiden. Protoplasma *41*, 168.

Boerner-Patzelt, D., 1950: Über ursächliche Faktoren der polychromen Fluoreszenz von Geweben und Gewebestrukturen nach Fluorochromierung mit einem Fluorochrom. Protoplasma *39*, 639.

Bogen, H. J., und H. Prell, 1953: Messung nichtosmotischer Wasseraufnahme an plasmolysierten Protoplasten. Planta *41*, 459.

Brand, V. v., 1955: Chinon und cancerogene Wirkung. Naturwiss. *42*, 300.

Bräutigam, F. und A. Grabner, 1949: Fluoreszenzmikroskopie. In: Beitrag zur Fluoreszenzmikroskopie. Wien.

Ciamician, G., und P. Silber, 1912: Chemische Lichtwirkungen. XXII. Autoxydationen I. Ber. dtsch. chem. Ges. *45*, 38.

— — 1913: Chemische Lichtwirkungen. XXVI. Autoxydationen VI. Ber. dtsch. chem. Ges. *46*, 417.

— — 1913: Chemische Lichtwirkungen. XXVIII. Autoxydationen VI. Ber. dtsch. chem. Ges. *46*, 3896.

Clark, W. M., and M. E. Perkins, 1932: Studies on oxydation-reduction. XVII. Neutral red. J. amer. Chem. Soc. *54*, 1228.

Drawert, H., 1940: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora *134*, 159.

— 1941: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora *135*, 21.

— 1948: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Z. Naturforsch. *3 b*, 111.

— 1952: Die Eigenfluoreszenz der Schuppenblattepidermis von *Allium cepa* L. und ihre Beeinflussung. Z. Bot. *40*, 407.

— 1953: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. Ber. dtsch. bot. Ges. *66*, 135.

— 1956: Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung. In: W. Ruhland: Hb. d. Pflanzenphysiol., Bd. II, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

— und H. Gutz, 1953: Zur vitalen Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblau. Naturwiss. *40*, 512.

— und M. Kärber, 1956: Zur Frage der Fluorochromierung von Granula in Hefezellen mit Berberinsulfat. Naturwiss. *43*, 161.

— und I. Metzner, 1955: Vitalfluorochromierungen mit Brillantkresylblaupräparaten verschiedener Herkunft. Ber. dtsch. bot. Ges. *68*, 385.

— — 1956: Untersuchungen zur vitalen Fluorochromierung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma *47*, 359.

— und S. Strugger, 1938: Zur Frage der Methylenblauspeicherung in Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. *56*, 43.

Epstein, L. F., F. Karush, and E. Rabinowitch, 1941: A spectrophotometric study of Thionine. J. opt. Soc. Amer. *31*, 77.

Gebhard, K., 1911: Zusammenhang zwischen Lichtempfindlichkeit und Konstitution von Farbstoffen. J. prakt. Chem. *84*, 561.

Glubrecht, H., 1953: Über die Wirkung von UV-Strahlen in somatischen Zellen. Z. Naturforsch. *8 b*, 17.

— 1956: In: Simonis, W., 1956, S. 674.

Grün, A., und Th. Wirth, 1920: Über die Oxydation von Paraffin zu Wachs im ultravioletten Licht. Angew. Chem. *33*, 291.

Gutz, H., 1956: Zur Analyse der Granula-Fluorochromierung mit Nilblau in den Hyphen von Mucor racemosus Fres. Planta *46*, 481.

— 1958: Ergänzende Beobachtungen zur Granulafluorochromierung mit Nilblau in Pilzzellen. Naturwiss. *45*, 519.

Höfler, K., 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie *2*, 13.

— 1948: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, *156*, 585.

— 1949: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. In: Bräutigam und Grabner, Beitr. z. Fluoreszenzmikroskopie, Wien.

— 1953: Zur Vital- und Fluoreszenzfärbung. Ber. dtsch. bot. Ges. *66*, 454.

Kärber, M., 1938: Untersuchungen über die granulären Einschlüsse der Hefezelle. Arch. Mikrobiol. *29*, 65.

Kailan, A., 1920: Über Reaktionen der durchdringenden Radiumstrahlung und im Quarzglasultraviolett. Z. phys. Chem. *95*, 215.

Kiermayer, O., 1955: Über die Reduktion basischer Vitalfarbstoffe in pflanzlichen Vakuolen. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, *164*, 275.

Kiermayer, O., 1956: Fluorochromierung pflanzlicher Zellen mit Fluoreszent X (reduziertem Neutralrot). Protoplasma *46*, 437.

Kinzel, H., 1954: Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften. Protoplasma *44*, 52.

— 1958a: Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe. (Eine Studie zum cytochemischen Aspekt der Vitalfärbung.) Protoplasma *50*, 1.

— 1958b: Referat zu: Bartels und Schwantes, 1957. Protoplasma *50*, 185.

Kölbel, H., 1947: Quantitative Untersuchungen über die Farbstoffspeicherung von Akridinorange in lebenden und toten Hefezellen und ihre Beziehung zu den elektrischen Verhältnissen der Zelle. Z. Naturforsch. *2b*, 382.

— 1948: Quantitative Untersuchungen über den Speicherungsmechanismus von Rhodamin B, Eosin und Neutralrot in Hefezellen. Z. Naturforsch. *3b*, 442.

Kriegel, H., und L. Herforth, 1957: Über die Einwirkung von langwelligem UV-Licht auf die Fluoreszenz cancerogener Kohlenwasserstoffe in verschiedenen Lösungsmitteln. II. Das Fluoreszenzverhalten der Lösungen bei verschiedenen Bestrahlungsintensitäten. Z. Naturforsch. *12b*, 41.

Kuttig, W., 1957: Weitere Beiträge zur Fluorochromierung der Sphärosomen pflanzlicher Zellen mit basischen Farbstoffen. Protoplasma *48*, 562.

Lewis, M. R., 1935: The effect of the vital dye fluoreszent X (reduced neutral red, Clark) on living chick embryo cells in tissue cultures. Arch. exper. Zellforsch. *17*, 96.

Miličić, D., 1957: Vitalfärbungsversuche mit reduziertem Neutralrot an „vollen" Zellsäften einiger höherer Pflanzen. Protoplasma *48*, 170.

Mix, M., 1958: Der Mechanismus der Sphärosomenfluoreszenz mit Oxazinen und anderen basischen Farbstoffen. Protoplasma *50*, 2.

Musso, H., 1958: Moderne Trennungsmethoden in der Chemie. Naturwiss. *45*, 97.

Perner, E. S., 1952: Zellphysiologische und cytologische Untersuchungen über den Nachweis und die Lokalisation der Cytochrom-Oxydase in *Allium*-Epidermiszellen. Biol. Zbl. *71*, 43.

Rabinowitch, E., and L. Epstein, 1941: Polymerization of dyestuffs in solution. Thionine and Methylene Blue. J. Amer. Chem. Soc. *63*, 69.

Rein, H., 1934: Neuere Arbeiten über Lichtwirkung auf Farbstoffe. Angew. Chem. *47*, 157.

Ruhland, W., 1908: Beiträge zur Kenntnis der Permeabilität der Plasmahaut. Jb. wiss. Bot. *46*, 1.

Schultz, G., 1931: Farbstofftabellen. 7. Aufl. Leipzig.

Sibatani, A., 1952: Differential staining of nucleic acids. I. Methylgreen-Pyronin. Cytologia *16*, 315.

— and M. Fukuda, 1952: Importance of controlling water content of the solvents for paper chromatographie. Biochem. (Tokyo) *38*, 181.

Simonis, W., 1956: Die Wirkung von Licht und Strahlung auf die Zelle. In: Ruhland, W.: Hb. d. Pflanzenphysiol., Bd. II, 655. Berlin-Göttingen-Heidelberg.

Strugger, S., 1940a: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma *34*, 601.

— 1940b: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jena Z. Naturw. *73*, 97.

— 1941: Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. I. Basische, zweifarbige Indikatoren. Flora *135*, 101.

— 1947: Die Vitalfluorochromierung des Protoplasmas. Naturwiss. *34*, 267.

Strugger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg.

Suida, M., 1912: Monatsh. f. Chem. (Wien) *33*, 1277, Zit. nach Bachér, 1929, S. 1475.

Tappeiner, H., und A. Jodlbauer, 1907: Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. Dtsch. Arch. klin. Med. *80*, 427.

Toth, A., 1952: Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht, Protoplasma *41*, 103.

Wuhrmann-Meyer, K. und W., 1941, Untersuchungen über die Absorption ultravioletter Strahlen durch Kutikular- und Wachsschichten von Blättern. Planta *32*, 43.

Wunderly, Ch., 1954: Die Papierelektrophorese. Methoden und Ergebnisse. Aarau und Frankfurt a. M.

Zanker, V., 1952: Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate („reversible Polymerisate") des Akridinorange durch Absorption- und Fluoreszenzmessungen in wäßriger Lösung. Z. phys. Chem. *199*, 225.

Druck von Adolf Holzhausens Nfg., Wien

Lebenslauf

Am 15. April 1930 wurde ich als zweiter Sohn des Stadtbücherei-direktors Dr. Bruno Sauer und seiner Ehefrau Eva geb. Dischler in Plauen geboren.
Von Ostern 1937 bis 1941 besuchte ich dort die Grundschule, darauf die Staatl. Oberschule für Jungen, an der ich 1949 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommer und Herbst 1945 war ich zwischendurch als Notstandsarbeiter bei der Stadt und in einem landwirtschaftlichen Betrieb tätig.
Bewerbungen an einer Hochschule waren zunächst erfolglos. Februar 1950 wurde ich als Waldarbeiter bzw. Forstfacharbeiterlehrling beim Kreisforstamt Plauen eingestellt. Erst Herbst 1951 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Biologie an der Universität Greifswald. Seit dem SS 1953 war ich an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert. November 1954 legte ich die Vordiplomprüfung ab. Vom WS 1956/57 als studentische Hilfskraft tätig, wurde ich am 1.10.1957 mit der Wahrnehmung der Stellung eines wissenschaftlichen Assistenten am Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität beauftragt.
Meine akademischen Lehrer waren vor allem die Herren Professoren H. Borriss, R. Bauch, R. Seifert, H. Schildmacher und Frau Dr. K. Voderberg an der Universität Greifswald, H. Drawert, Th. Eckardt, E. Werdermann, K. Herter, H. Nachtsheim und W. Ulrich an der Freien Universität Berlin.